

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Patogenetikai tényezők vizsgálata rheumatoid arthritisen és szisztémás lupus erythematosusban

Dr. Nagy György



SEMMELWEIS EGYETEM

III. SZ. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA
REUMATOLÓGIAI TANSZÉKI CSOPORT

GENETIKAI, SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI
INTÉZET



BUDAI IRGALMASRENDI
KÓRHÁZ

Budapest

2014

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	6
2. Előszó.....	11
3. Irodalmi háttér.....	12
3.1. A tolerancia, a természetes és kóros autoimmunitás.....	12
3.2. Kóroki tényezők RA-ban és SLE-ben.....	14
3.2.1. Genetikai faktorok.....	14
3.2.2. Környezeti tényezők.....	15
3.2.3. Immunregulációs zavar.....	18
3.2.3.1. Autoantitestek RA-ban.....	18
3.2.3.2. Autoantitestek SLE-ben.....	19
3.2.4. Effektor tényezők.....	19
3.2.4.1. A klinikai tünetek kialakulása, a betegség kezdete.....	19
3.2.4.2. Citokinek, kemokinek.....	20
3.2.4.3. T-lymphocyták.....	20
3.2.4.4. B-lymphocyták.....	24
3.2.4.5. Monocyták, dendritikus sejtek.....	25
3.2.4.6. Az extracelluláris vesiculák.....	25
3.2.4.7. A nitrogén-monoxid és a hisztamin.....	25
3.2.4.8. A komplementrendszer.....	26
3.2.5. A gyulladás késői következményei.....	27
3.2.6. Hasonlóságok és különbségek az RA és az SLE patogenezisében, klinikai képében és kezelésében.....	27
4. Célkitűzések.....	30
5. Módszerek.....	31
5.1. Betegek és kontrollok.....	31
5.2. T-lymphocyta- és fibroblastszeparálás és sejt kultúra.....	31
5.2.1. T-lymphocyta.....	31
5.2.2. Fibroblast.....	32
5.3. NO- és ROI-kezelés és -gátlás.....	32
5.4. Állatmodellek.....	32
5.4.1. Hisztidin-dekarboxiláz génkiütött (HDC-KO) állat.....	32
5.4.2. Aggregán indukálta arthritis.....	33

5.5. Áramlási citometria	33
5.5.1. A mérésekhez használt készülékek, a mérések értékelése, a sejtek életképességének és a sejtproliferációnak a mérése	33
5.5.2. Citoplazmatikus és mitokondriális Ca^{2+} -mérés és Ca^{2+} -kelálás	34
5.5.3. Mitokondriális membránpotenciál és mitokondrium mennyiség mérése	34
5.5.4. NO- és ROI-mérés	34
5.5.5. Extracelluláris vesiculák mérése	34
5.6. Konfokális mikroszkópia	35
5.7. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM), atomerő mikroszkópia (AFM)	35
5.7.1. TEM	35
5.7.2. AFM	36
5.8. Tömegspektrometria	36
5.9. Western blot	36
5.10. ELISA és ELISPOT módszerek	37
5.10.1. ELISA	37
5.10.2. ELISPOT	38
5.11. Nitrit/nitrát- és ATP-mérés	38
5.12. PCR, RT PCR, transzfekció	38
5.12.1. Polimorfizmus-vizsgálatok	38
5.12.2. RT-PCR	38
5.12.3. Transzfekció	39
5.13. Enzimhisztokémia és immunhisztokémia	39
5.13.1. Glikozidázok azonosítása enzimhisztokémiával	39
5.13.2. Immunhisztokémia	40
5.13.2.1. Glükózaminoglikán- (GAG) ellenes antitestek vizsgálata	40
5.13.2.2. CK7, PAD4 és citrullinált proteinek szöveti kifejeződésének vizsgálata	40
5.14. Citrullint tartalmazó peptidek szintézise	40
5.15. Extracelluláris vesiculák izolálása, differenciál detergens lízis	42
5.15.1. EV-k izolálása	42
5.15.2. Differenciál detergens lízis	42
5.16. Dinamikus fényszórásmérés (DLS) és Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	42
5.16.1. DLS	42
5.16.2. NTA	42
5.17. Turbidimetria	43

5.18. Statisztikai módszerek	43
6. Eredmények és megbeszélés	44
6.1. Természetes autoantitestek vizsgálata RA-ban	44
6.1.1. GAG-antitestek RA-ban	44
6.1.2. Megbeszélés	46
6.2. Genetikai polimorfizmusok tanulmányozása	46
6.2.1. Galektin-8-polimorfizmus	46
6.2.2. HCgp-39-polimorfizmus	48
6.2.3. Megbeszélés	48
6.3. A citrullináció szerepének vizsgálata a tolerancia elvesztésében; citrullinált proteinek elleni antitestek specifitásának és antigénkötésének vizsgálata	48
6.3.1. Citrullináció immunogenitásának vizsgálata tüdőrákban	48
6.3.2. Immundomináns T-lymphocytá-epitop citrullinációjának vizsgálata kísérletes arthritisben	53
6.3.3. Citrullint tartalmazó filaggrin peptidek antigenitásának vizsgálata	54
6.3.3.1. Az N- és C-terminális biotinizáció szerepének vizsgálata az antigenításban	54
6.3.3.2. Filaggrin, vimentin és kollagén peptidek antigenitásának vizsgálata	56
6.3.4. Megbeszélés	57
6.4. C1-inhibitor elleni autoantitestek SLE-ben	59
6.4.1. Fokozott C1-inhibitor elleni antitest-termelés SLE-ben	59
6.4.2. Megbeszélés	60
6.5. Az NO szerepének vizsgálata a T-lymphocytá-aktivációban	60
6.5.1. Az NO mitokondriális hiperpolarizációt indukál humán T-lymphocytákban	60
6.5.2. Az NO által indukált mitokondrium-bioszintézis befolyásolja a Ca^{2+} szignált SLE-s betegek T-lymphocytáiban	66
6.5.3. A T-lymphocyták NO-termelése fokozott RA-ban	73
6.5.4. Az NO szabályozza a HDC-KO egér T-sejtjeinek citokintermelését	75
6.5.5. Megbeszélés	82
6.6. A CD3- ζ -expresszió szabályozásának vizsgálata	85
6.6.1. A TNF- α szabályozza a CD3- ζ kifejeződését humán T-lymphocytákon	85
6.6.2. Megbeszélés	99
6.7. Glikozidázok szerepének vizsgálata RA-ban	100
6.7.1. Glikozidázok kifejeződése synovialis mintákban	100
6.7.2. Hexozaminidáz D vizsgálata	104
6.7.3. Megbeszélés	105

6.8. Extracelluláris vesiculák karakterizálása és vizsgálata	106
6.8.1. Preanalitikai tényezők szerepe az extracelluláris vesiculák mérésében	106
6.8.2. Extracelluláris vesiculák rheumatoid arthritisben	109
6.8.3. Megbeszélés	111
7. Az új tudományos eredmények összefoglalása, gyakorlati jelentősége	113
7.1. A tudományos eredmények összefoglalása	113
7.2. A tudományos eredmények potenciális gyakorlati jelentősége.....	116
8. Saját publikációk jegyzéke, tudományometriai adatok	117
8.1. Az értekezés alapját képező közlemények	117
8.2. További közlemények, könyvfejezetek	121
8.3. Tudományometriai adatok.....	126
9. Köszönetnyilvánítás	127
10. Irodalomjegyzék	129

1. Rövidítések jegyzéke

AC	apoptotikus sejt
ACPA	citrullinált protein ellenes antitest
AFM	atomerő mikroszkópia
AKA	anti-keratin antitest
AM	acetoxi-metilészter
2-APB	2-aminoetoxi-difenil borán
APC	antigénprezentáló sejt
APF	anti-perinukleáris faktor
ATP	adenozin-trifoszfát
BAFF	B cell-activating factor/B-sejt-aktiváló faktor
BAPTA-AM	1,2-bisz(o-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav-AM
BCA	bicinchoninic acid/bicinchoninic sav
BCR	B cell receptor/B-sejt-receptor
BLyS	B lymphocyte stimulator/B-lymphocyt-stimuláló
Breg	szabályozó/regulátoros B-sejt
BSA	bovin szérumalbumin
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
CFA	komplett Freund-adjuváns
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester/karboxifluorescein-szukcinimidil-észter
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CHI3L1	chitinase 3 like 1
CI	konfidenciintervallum/megbízhatósági tartomány
CIA	kollagénindukált arthritis
CK7	citokeratin-7
ConA	conavalin A
C-PTIO	karboxi-2-fenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazolin-1-oxid-3-oxid
CRP	C-reaktív protein
CTLA-4	citotoxikus T-lymphocyt antigen 4
CTX	koleratoxin
D	dohányos
DA	dohányos asthmás beteg

DAB	diaminobenzidin
DAF-FM	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein-diacetát
DAG	diacilglicerol
DAS	disease activity score/betegségaktivitási pontszám
DIC/HOBt	diizopropilkarbodiimid/1-hidroxi-benzotriazol
diff.adeno:	differenciált adenocarcinoma
DiOC6	3,3-dihexiloxakarbocianin-jodid
DK	dohányos kontroll
DLS	dynamic light scattering/dinamikus fényszórásmérés
DMARD	disease modifying anti-rheumatic drug/betegségmódosító antireumatikus gyógyszer
DMF	dimetilformamid
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfát
DS	dohányos sarcoidosis
dsDNS	dupla szálú DNS
DT	dohányos tumoros
EBV	Epstein–Barr-vírus
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunosorbent spot
EV	extracelluláris vesicula
FBS	foetal bovine serum/magzati marhaszérum
FCS	foetal calf serum/borjúszerum
Fmoc	fluorenilmetiloxi-karbon
GAG	glükózaminoglikán
GHI3L1	chitinase 3 like 1/kitináz 3 szerű 1
GMCSF	granulocyta–macrophag kolóniastimuláló faktor
GusB	β -D-glükuronidáz
HCgp-39	human cartilage glycoprotein 39/emberi porc glikoprotein 39
HDC-KO	hisztidin-dekarboxiláz knockout/génkiütött
HE	hidroetidin
Hex	hexozamonidáz
HGPRT	hipoxantin-guanin foszforibozil-transzferáz

HLA	humán leukocytantigén
HWE	Hardy–Weinberg-equilibrium
IFN	interferon
IL	interleukin
IP3	inozitol-1,4,5-trifoszfát
ITAM	intracelluláris IgR family tyrosine based activation motif
JC1	5,5',6,6'tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetil benzimidazolokarbocianin-jodid
JIA	juvenilis idiopathiás arthritis
LAMP1	Lysosome-Associated Membrane Protein 1/lizoszóma-asszociált membránfehérje 1
LAT	linker for activation of T cells
MBHA	metilbenzidrilamin
MHC	major histocompatibility complex
MHP	mitokondriális hiperpolarizáció
miRNS	mikroRNS
MMP/ $\Delta\psi_m$	mitokondriális membránpotenciál
MnTBAP	mangán (III) tetrakis (4-benzoészav)porfirin-klorid
mRNS	messenger RNS
MTG	mitotracker green
MV	mikrovesicula
MVB	multivesicularis test
N	nem dohányos
NA	nem dohányos asztmás
NAG	N-acetil-glükózaminidáz
NAO	nonyl acridine orange
NC	nekrotikus sejt
nem diff. adeno	differentiálatlan adenocarcinoma
nem szekr	nem szekretáló tumor
NK	nem dohányos kontroll
NO	nitrogén-monoxid
NOC-18	NO donor (Z)-1-[2-(2-aminoetil)-N-(2-ammonioetil)amino]diazen-1-ium-1,2-diolát dietiléntriámin
NOS	nitronénmonoxid-szintetáz
NS	nem dohányos sarcoidosisos beteg

NSCLC	nem kissejtes tüdőrák
NT	nem dohányos daganatos beteg
NTA	nanoparticle tracking analysis
OR	odds ratio/esélyhányados
PAD	peptidil-arginin-deimináz
PARP	poli-ADP-riboziltraszferáz
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejt
PBS	phosphate buffer saline/foszfátpuffer só
PCR	polimeráz-láncreakció
PFA	paraformaldehid
PGC-1 α	peroxiszóma proliferátor λ receptor 1 α
PGIA	proteoglikán-indukált arthritis
PG-TCR TG	proteoglikán aggregán T-sejt-receptor transzgénikus
PHA	phytohaemagglutinin
PI	propidium-jodid
PLC	foszfolipáz C
PTPN22	proteintirozinfoszfátáz, nem receptor fajta 22
RA	rheumatoid arthritis
RANKL	receptor activator of nuclear factor κ B ligand/a nukleáris faktor κ B ligand receptoraktivátora
Rel.f	relatív fluoreszcencia
RF	rheumatoid faktor
Rhod-2	xanthylum, 9-[4-[bisz[2-[(acetiloxi)metoxi]-2-oxoetil]amino]-3-[2-[2- [bisz[2-[(acetiloxi)metoxi]-2-oxoetil]amino]fenoxi]etoxi]fenil]-3,6- bisz(dimetilamino)-, bromid
RNS	ribonukleinsav
ROI	reaktív oxigén intermediér
RP-HPLC	reversed phase high performance liquid chromatography/fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
RT	real time/valós idejű
RUNX1	runt related transcription factor 1
SCLC	kissejtes tüdőrák
SE	shared epitop/közös epitóp
SEM	standard error of the mean/az átlag standard hibája

SF	synovialis fibroblast
SFL	synovialis folyadék
siRNA	small interfering RNA/kis interferáló RNS
SLAP	Src-like adaptor protein/src-szerű adaptor fehérje
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SLEDAI	systemic lupus erythematosus disease activity index/SLE betegségaktivitási index
SM	synovialis membrán
SNP	single nucleotid polymorphism/egyesnukleotid-polimorfizmus
SSC	laphámrák
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tc	citotoxikus T-sejt
TCR	T-cell receptor/T-sejt-receptor
TEM	transzmissziós elektronmikroszkópia
TGF	transforming growth factor/transzformáló növekedési faktor
Th	helper T-sejt
TMA	tissue microarray
TMRM	tetrametilrhodamin-metilészter-perklorát
TNF	tumornekrózis-faktor
TNFAIP3A	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3/tumornekrózis-faktor alfa által indukált protein 3
Treg	szabályozó/regulátoros T-sejt
UV	ultraibolya
ZAP-70	ζ associated protein 70

2. Előszó

Az elmúlt évtizedben az orvostudomány majd minden területén látványos fejlődésnek lehettünk tanúi, talán nem túlzás, ha az immunológiát az egyik leggyorsabban fejlődő tudományágnak tekintjük. Az immunológiai alapismeretek, a betegségek patomechanizmusának mind részletesebb feltárása, újabb és újabb gyógyszerek megjelenése jól tükrözi ezt a rohamos fejlődést. Hetente jelennek meg alapvetően fontos megfigyeléseket bemutató új közlemények, sokszor a megdönthetetlennek hitt alapismereteknek adva egészen új értelmezést, ugyanakkor számos jelenség pontos megismerése még várat magára. A nem immunológiai betegségekről gyakran kiderül, hogy immunológiai tényezőknek is szerepük lehet kialakulásukban, így ma már az immunológiai szemlélet nem nélkülözhető egyik klinikai szakterületen sem. A szisztémás autoimmun kórképek osztályozása, diagnózisa és terápiája szintén folyamatosan változik. A biológiai terápiák megjelenése és mind szélesebb körben megfigyelhető elterjedése valódi áttörést eredményezett több immunológiai betegség kezelésében. Nagyszámú klinikai vizsgálat teszi lehetővé, hogy a leghatékonyabb módon és a legbiztonságosabban kezeljük betegeinket. A transzlációs szemlélet segítségével, amely kifejezetten jellemző az immunológiára, megtalálhatók olyan összefüggések az alapkutatás a klinikai kutatás és a gyógyszerfejlesztés között, amelyek gyorsabbá teszik a kísérletes eredmények hasznosítását a klinikai gyakorlatban. Ez a szemlélet jelentősen hozzájárul a biotechnológia és az innovatív gyógyszergyártás fejlődéséhez. Az értekezés témájaként a rheumatoid arthritist (RA) és a szisztémás lupus erythematosust (SLE) választottam, két olyan szisztémás autoimmun kórképet, amelyekkel klinikusként és kutatóként is foglalkozom. Mindkét kórképről rendelkezésre álló ismeretek bővülése jól mutatja az immunológia szépségét és páratlanul gyors fejlődését.

3. Irodalmi háttér

3.1. A tolerancia, a természetes és kóros autoimmunitás

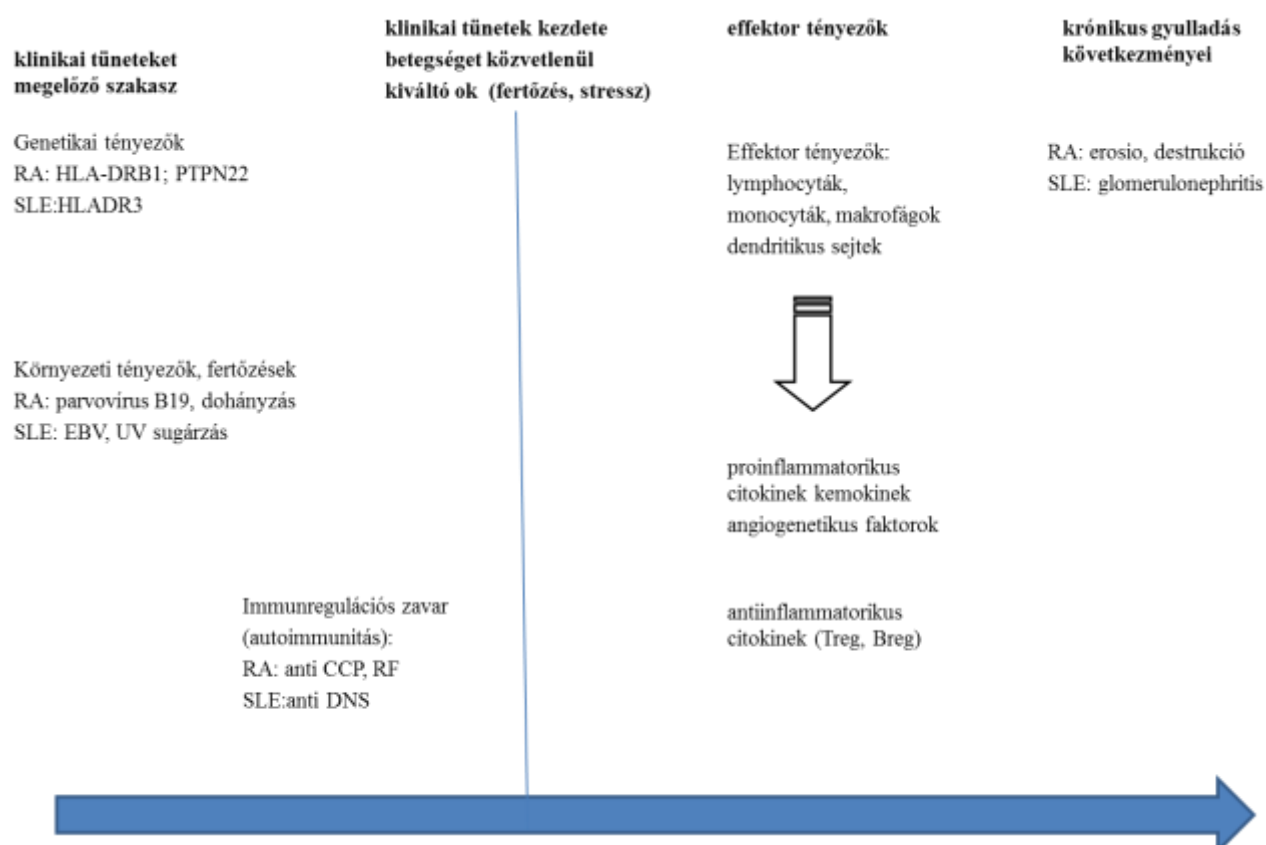
Immunrendszerünk fiziológiás működéséhez szükséges a természetes és az adaptív immunválasz összehangolt működése. A filogenetikailag régebbi természetes immunrendszer a fertőzések elleni védelem első vonalát képezi, nem specifikus a szervezetet érő kórokozóra, és nem rendelkezik immunológiai memóriával. Sejtjei a makrofágok, monocyták, granulocyták és a dendritikus sejtek. Az adaptív immunrendszer immunológiai memóriával rendelkezik, aktivációja időigényesebb, kórokozóra specifikus, sejtjei a T- és a B-lymphocyták [1, 2].

Az immunrendszer sokrétű feladatai közé tartozik a szervezet védelme a fertőzésektől valamint a daganatok növekedésének gátlása. A patogének elleni védelemhez a saját és nem saját elkülönítése, a daganatok felismeréséhez pedig a megváltozott saját struktúrák azonosítása szükséges. A kórokozók vagy a daganatos sejtek nem kellő hatékonysággal történő eliminációja betegséghez vezethet. Az egészséges saját struktúrák ellen nem alakul ki destruáló immunválasz, ezt **toleranciának** nevezzük. A nagymértékben konzervált antigének (többek között hősokkproteinek, DNS) ellen a CD5+ B1-lymphocyták IgM izotípusú, kis affinitású, védő funkciót betöltő antitesteket termelnek, melyek a **természetes autoimmunitás** részét képezik. A természetes autoantitestek pontos funkciója ma még nem ismert, feltehetően az apoptotikus sejtek felszínéhez kötődve azok eliminációját segítik. Irodalmi adatok szerint a természetes autoantitestek MRL-lpr egérben gátolják a proteinuriát és a vesében történő immunkomplex-lerakódást, javítva az állatok túlélését [3].

A tolerancia több szinten, rendkívül pontosan szabályozott módon működik, centrális toleranciát és perifériás toleranciát különíthetünk el. A centrális tolerancia az elsődleges immunszervekben (thymus, csontvelő), zajló folyamat eredményeképpen jön létre, a potenciálisan autoreaktív lymphocyták felismerését és eltávolítását jelenti. A perifériás tolerancia biztosításáért felelős: 1. antigén-szegregáció: az immunprivilegizált helyeken, pl. agy, here, az immunválasz jellege eltér; 2. anergia (kostimuláció hiánya); 3. immunsuppresszív hatású, szabályozó T- lymphocyták és B- lymphocyták; 4. citokinegyensúly (a gyulladás helyén Th2 típusú citokinek jelenléte). Az egészséges saját struktúrákkal szembeni tolerancia sérülése **kóros autoimmunitáshoz, autoimmun betegséghez** vezethet. A tolerancia tehát igen jól szabályozott, komplex rendszer

működésének eredményeként jön létre, a rendszer sérülése **immunregulációs zavarhoz** vezethet, aminek következtében specifikus B- és T- lymphocyták alakulhatnak ki. A természetes és az adaptív immunrendszer működése is megváltozhat autoimmun betegségekben. Az autoimmun betegségek többsége multifaktoriális, kialakulásukban alapvető szerepe van **genetikai faktoroknak, környezeti tényezőknek** (például egyes fertőzéseknek) és a betegség kialakulását sokszor évekkel is megelőző, a **tolerancia sérülésére utaló immunregulációs zavarnak** [4, 5]. A hajlamosító tényezők összessége, a kórkép kiváltásához szükséges küszöbértéket elérve betegséghez vezet. Effektor tényezők, így például **citokinek és kemokinek** felelősek a gyulladás kialakulásáért, mely végül irreverzibilis **szöveti károsodáshoz** vezethet.

A rheumatoid arthritis (RA) elsősorban a kéz és a láb kisízületeit érintő szisztémás autoimmun kórkép, prevalenciája 0,4-0,6 százalék, nők körében háromszor gyakrabban fordul elő. A szisztémás lupus erythematosus (SLE) igen színes klinikai képpel járó szisztémás autoimmun kórkép, szinte minden szervet érinthet, gyakori a bőr-, ízületi, vese-, hematológiai, központi idegrendszeri érintettség, nőkben kilencszer gyakoribb, mint férfiakban, prevalenciája nők körében 1:800-1000 közé tehető. A következő fejezet az RA és az SLE példáján keresztül áttekinti az autoimmun betegséghez vezető tényezőket.



1. ábra. A rheumatoid arthritis és a szisztémás lupus erythematosus patomechanizmusa. *Autoimmun betegségek patomechanizmusa (Nagy Gy. könyvfejezet, In: Szekanecz Z. Reumatológia: egyetemi jegyzet) alapján [4]. A szisztémás autoimmun betegségek kialakulásában szerepet játszó genetikai tényezők, környezeti tényezők és immunregulációs zavar évekig jelen lehetnek a betegség kialakulása előtt. Effektor tényezők felelősek a gyulladás kialakulásáért, a betegségek tartós fennállása a célszervek strukturális és funkcionális károsodásával járhat.*

3.2. Kóroki tényezők RA-ban és SLE-ben

3.2.1. Genetikai faktorok

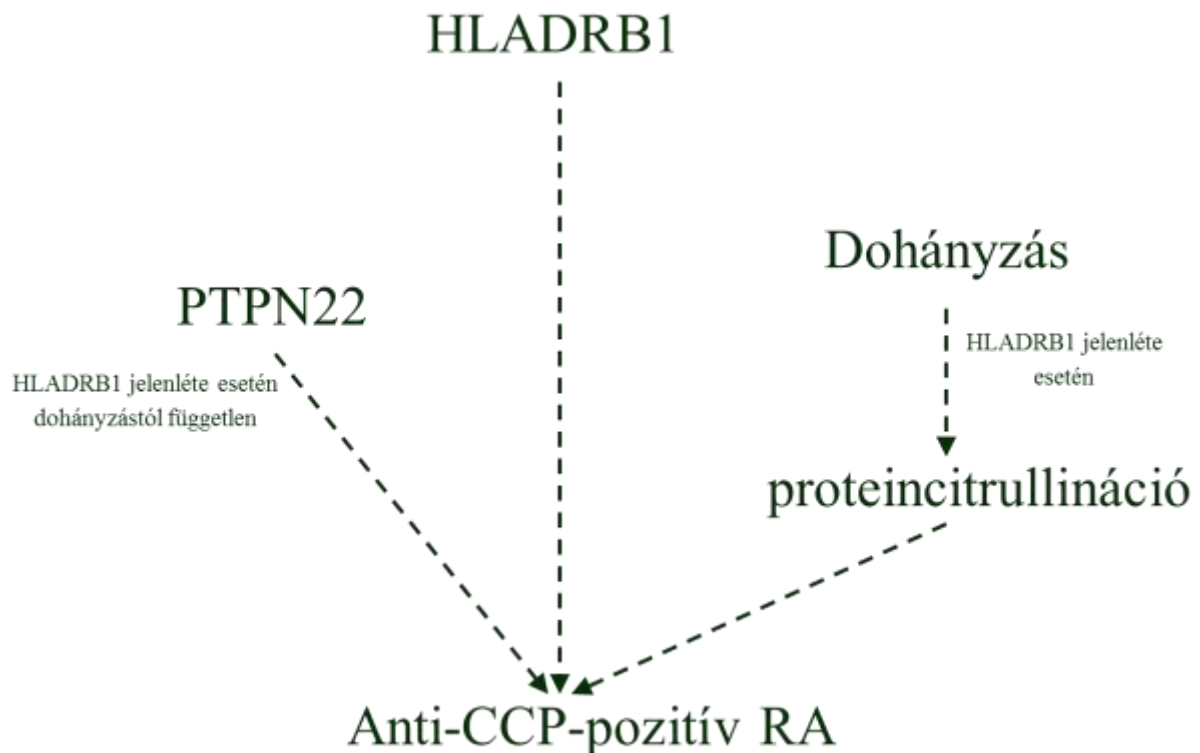
RA-ban jelentős szerepe van genetikai tényezőknek, a betegség konkordanciája egypetűjű ikrekben 30-50 százalék. Az RA és az MHC gének kapcsolata évtizedek óta kutatás tárgyát képezi, a humán leukocitaantigén (HLA) -DRB1 allél az egyik legtöbbet vizsgált RA-ra hajlamosító gén. Közös a HLA-DRB1 allélekben a shared epitóp (SE) szekvencia, mely a 70-74 aminosav a DR béta-lánc harmadik hipervariábilis régiójában (glutamin-leucin-arginin-alanin-alanin szekvencia) [6]. A HLA-DRB1 mellett a PTPN22 a másik legfontosabb genetikai tényező RA-ban (*lásd alább is*). Számos más gén asszociációját is igazolták [7].

Az SLE konkordanciája egypetűjű ikrekben 40-60 százalék, a HLA DRB1*1501 (DR2), DRB1*0301 (DR3) is hajlamosít SLE-re. RA-ban és SLE-ben is fontos szerepe van az MHC gének mellett számos más génnek is [8]. A protein-tirozinfoszfátáz (PTP) enzim polimorfizmusa több autoimmun betegségben ismert, így többek között gyulladásos reumatológiai kórképekre (RA, SLE, szisztémás sclerosis), 1-es típusú diabetes mellitusra és Graves-kórra is hajlamosít. A PTPN22 protein szerepet játszik a B- és T-lymphocyták aktivációjában, a 620. pozícióban lévő aminosav cseréje argininről triptofánra (PTPN22R620W) a BCR és TCR szignált gátolja és hozzájárulhat a T- és B-sejt-tolerancia csökkenéséhez [9]. A PTPN22 tehát több autoimmun kórképre hajlamosít és a jelenlévő egyéb genetikai és környezeti tényezőktől függ, hogy kialakul-e betegség, és ha igen mely kórkép alakulhat ki a polimorfizmus jelenlétében.

SLE-re hajlamosítanak továbbá többek között: az 1-es kromoszóma 1q23-24 régiójában elhelyezkedő C-reaktív protein (CRP) gén egyes haplotípusai, az IgG tartalmú immunkomplexek receptorainak (FCGRIIA, FCGRIIB, FCGRIIAA, FCGRIIIB) polimorfizmusai vagy a poli-ADP-riboziltraszferáz (PARP) enzim promoter régiójában elhelyezkedő CA dinukleotid repeat polimorfizmus. Tumornekrózis-faktor (TNF) α -promoter polimorfizmust leírtak RA-ban és SLE-ben, a felsorolt néhány példán kívül nagyszámú polimorfizmust igazoltak mindkét betegségben. Ma már lehetséges mintánként több millió polimorfizmus egyidejű vizsgálata, és a teljes genom is szekvenálható, így az autoimmun betegségek iránti genetikai fogékonyság jó közelítéssel meghatározható. A genetika mellett epigenetikai faktorok (acetiláció, metiláció, foszforiláció, ubiquitináció és sumoiláció) is központi szerepet játszanak az SLE és az RA patomechanizmusában [10].

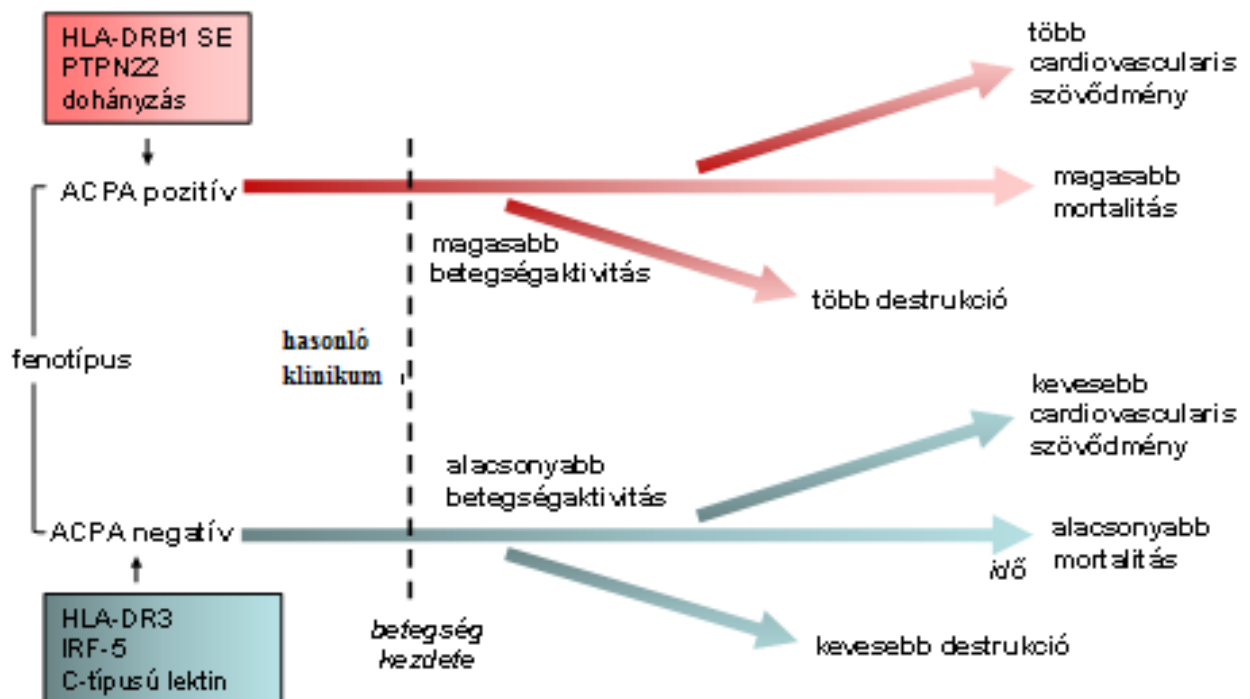
3.2.2. Környezeti tényezők

A környezeti tényezőknek is alapvető szerepe van az autoimmun kórképek patomechanizmusában, így fertőzések, dohányzás, vegyi anyagok is hozzájárulhatnak a betegségek kialakulásához. A dohányzás és az RA kapcsolata évtizedek óta ismert, újabb irodalmi adatok szerint a HLA-DRB1 hordozása és a dohányzás együttesen hajlamosíthat az anti-citrullinált protein antitest (ACPA) -pozitív RA-ra (lásd az ACPA-ról részletesebben a **3.2.3.1.** fejezetet is) [11, 12]. Más megfigyelések szerint a dohányzás hatása HLA-DRB1-hordozás esetén nem jelentős rizikófaktor a ACPA-pozitív RA-nak [13]. A HLADRB1 és a PTPN22, az RA két legfontosabb genetikai rizikófaktor, nem egymástól függetlenül járul hozzá a betegséghez. Irodalmi adatok alapján a PTPN22 főként a HLADRB1 jelenléte esetén rizikófaktor [14] (2. ábra). A dohányzás és a PTPN22 kapcsolatáról eltérő eredményeket publikáltak, egyes megfigyelések szerint a PTPN22 független a dohányzástól [14], míg más megfigyelések szerint a PTPN22 ACPA-pozitív RA-ra hajlamosít [15].



2. ábra. A dohányzás és genetikai faktorok RA-ban. Kallber H et al, Am J Hum Genet 2007. alapján) [14]. A HLA-DRB1 jelenléte és a dohányzás ACPA-pozitív RA-ra hajlamosít, feltehetően a tüdőben lévő proteinek citrullinációján keresztül. PTPN22 főként a HLADRB1 jelenléte esetén rizikófaktor és független a dohányzástól.

RA-ban a dohányzás szerepe igazoltnak tekinthető [16, 17]. Ez a betegség jó példát szolgáltat arra vonatkozóan, hogy genetikai és környezeti faktorok együttesen hogyan befolyásolhatják egy autoimmun kórkép kialakulását. Ma még nem ismert részleteiben, hogy a dohányzás milyen szerepet játszik az RA patomechanizmusában, feltehetően a dohányfüst stimulálhatja a tüdőben is kifejeződő 2-es típusú peptidil-arginin-deimináz (PAD, lásd a 3.2.3.1. fejezetben is) enzimet, mely a tüdőben proteinek citrullinálódásához vezethet (2-3. ábra) [18]. Az ACPA-pozitív és ACPA-negatív RA genetikai háttere jelentősen különbözik [19], továbbá az ACPA-pozitivitás rossz prognosztikai tényező RA-ban [18].



3. ábra. A citrullinált protein ellenes antitest (ACPA)-pozitív és ACPA-negatív RA jellemzői: HLA-DRB1, PTPN22 és a dohányzás ACPA-pozitív RA-ra hajlamosít. Az ACPA-negatív és az ACPA-pozitív betegség genetikai háttere jelentősen eltér. A betegség két alcsoportjának klinikai tünetei hasonlóak, ugyanakkor az ACPA-pozitív csoportban várhatóan nagyobb a betegségaktivitás, nagyobb a mortalitás és nagyobb a cardiovascularis kockázat, tehát az ACPA-pozitivitás rossz prognosztikai faktornak tekinthető [18].

A napsugárzás SLE-t aktiváló szerepe jól ismert, különösen az ultraibolya (UV) B sugárzás indíthatja be, vagy aktiválhatja a betegséget. Az UVB sugárzás a keratinocyták apoptózisát és ennek következtében intracelluláris antigének sejtekből történő kijutását eredményezheti, melynek szerepe lehet a kóros autoimmunitás kialakulásában. Fertőzések szintén hozzájárulhatnak mind az RA, mind az SLE kialakulásához, mindkét betegségben szerepe lehet számos vírusnak és baktériumnak, néhány példát említve: SLE-ben és RA-ban is szerepe lehet az Epstein–Barr-vírusnak (EBV), feltételezhető a parvovírus B19, a lentivírusok vagy a rubeola szerepe RA-ban [16, 17].

3.2.3. Immunregulációs zavar

A szisztémás autoimmun kórképeket akár évekkel megelőzően kialakulhat a kóros autoimmunitásra utaló immunregulációs zavar, mely elsősorban antitestek és/vagy specifikus T-lymphocyták megjelenésével jár, és jelenléte valószínűsíti az autoimmun betegség kialakulását.

3.2.3.1. Autoantitestek RA-ban

Az antitestek Fc része ellen termelődő autoantitest a rheumatoid faktor (RF), RA mellett SLE-ben és más szisztémás autoimmun kórképekben, fertőzések során vagy egészséges idős egyéneken is gyakran kimutatható. RA-ban az RF rossz prognosztikai faktor, szintje nem korrelál a betegség aktivitásával. Az RF azonosítása volt az egyik első, az RA autoimmun jellege mellett szóló érv. RA-ra specifikus, ritkán más betegségekben vagy egészségesekben is előfordulhatnak a citrullinált proteinek ellen termelődő antitestek (ACPA). A betegség 2010-es klasszifikációs [20] kritériumainak is a részét képezi az ACPA. 1964-ben írták le az anti-perinukleáris faktort (APF), mely RA-s betegek szérumában kimutatható, szájnálkahártyasejtek 0,5-0,7 μm méretű perinukleáris keratohialin granulumaival reagáló antitest [21, 22]. 1979-ben azonosították a nyelőcső keratinszerű struktúráit felismerő antitestet (AKA), mely az APF-hez hasonlóan indirekt immunfluoreszcenciával határozható meg [23]. Az APF és az AKA hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, mindkettő specifikusnak bizonyult RA-ra. 1995-ben igazolódott, hogy az APF és az AKA autoantitestek egyaránt az epithelialis filament-aggregating protein (filaggrin) ellen termelődnek [24]. A filaggrin hámsejtekben kifejeződő protein, a bőr barrier funkciójának fenntartásában alapvető szerepe van, ugyanakkor az ízületekben nem található meg [25]. Néhány évvel később az igazolódott, hogy a citrullint tartalmazó filaggrin ellen irányulnak az APF és az AKA antitestek is [26, 27], a filaggrin citrullinálódása szükséges az antigenitásához. A citrullinált proteinek polipeptidek módosításával, poszttranszlációs modifikációval szintetizálódnak, nem *de novo* proteinszintézis során (citrullin tRNS-t nem ismerünk). A peptidilarginin deimináz (PAD) enzimek hatására a polipeptidekben lévő arginin citrullinná alakul. Az ízületekben synovitis során citrullint tartalmazó proteinek mutathatók ki, citrullinált fibrin vagy intracelluláris proteinek közül a citrullinált vimentin, továbbá a citrullinált alfa-enoláz indíthatja be és tarthatja fenn az ACPA-termelést [16]. A fibrint a sejtekből apoptózis és nekrozis során kijutó

PAD enzimek citrullinálják. A citrullinált proteinek feltehetően alapvető szerepet játszanak a saját antigénekkal szembeni tolerancia áttörésében [16].

3.2.3.2. Autoantitestek SLE-ben

Az SLE-re jellemző az intracelluláris antigének elleni antitestek (antinukleáris antitestek, anti-DNS antitest) termelődése [28]. A betegségre jellemző fokozott nekrozisnak és apoptózisnak feltehetően szerepe van a citoplazmatikus és sejtmagfehérjék és nukleinsavak elleni antitesteknek a termelődésében. 1957-ben írták le első alkalommal az SLE-re meglehetősen specifikus anti-DNS antitestet [29, 30], mely a betegség klasszifikációs kritériumainak részét képezi [31]. Az anti-DNS antitestek szintje a betegség aktivitásával többnyire változik [28, 32], magas anti-DNS szérumszint akár évekkal az SLE diagnózisának felállítása előtt is jelen lehet a betegek jelentős részében [33, 34]. Korábbi eredményeink alapján az anti-DNS- és a neopterinszint együttes értékelése jól jelzi a betegség klinikai aktivitását [32].

A B-sejt-aktiváció eredményeképpen számos protein, glikoprotein, szénhidrát és lipid elleni antitest termelődését is igazolták SLE-ben [8]. A vizsgált antitestek különböző mértékben korrelálnak az SLE klinikai aktivitásának mérésére használható systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI) értékével.

3.2.4. Effektor tényezők

3.2.4.1. A klinikai tünetek kialakulása, a betegség kezdete

A fent leírt genetikai, környezeti faktorok és az immunregulációs zavarnak tekinthető toleranciasérülés (mely a betegség kialakulását évekkal megelőzheti) autoimmun betegség kialakulásához vezethet, ma még nem tudjuk pontosan, melyek azok a tényezők amelyek közvetlenül a klinikai tünetek megjelenését eredményezik. Fertőzések, dohányzás, pszichés tényezők, hormonális változások szerepet játszhatnak az RA és az SLE kialakulásában. A következő fejezetek röviden összefoglalják a gyulladás kialakulásában és szabályozásában szerepet játszó **citokineket, kemokineket, az adaptív és a természetes immunválasz sejttypusait**, a 3.2.4.6., 3.2.4.7. és a 3.2.4.8. fejezetek tárgyalják az **extracelluláris vesiculáknak, a nitrogén-monoxidnak (NO), a hisztaminnak és a komplementrendszernek** a gyulladás szabályozásában betöltött szerepét.

3.2.4.2. Citokinek, kemokinek

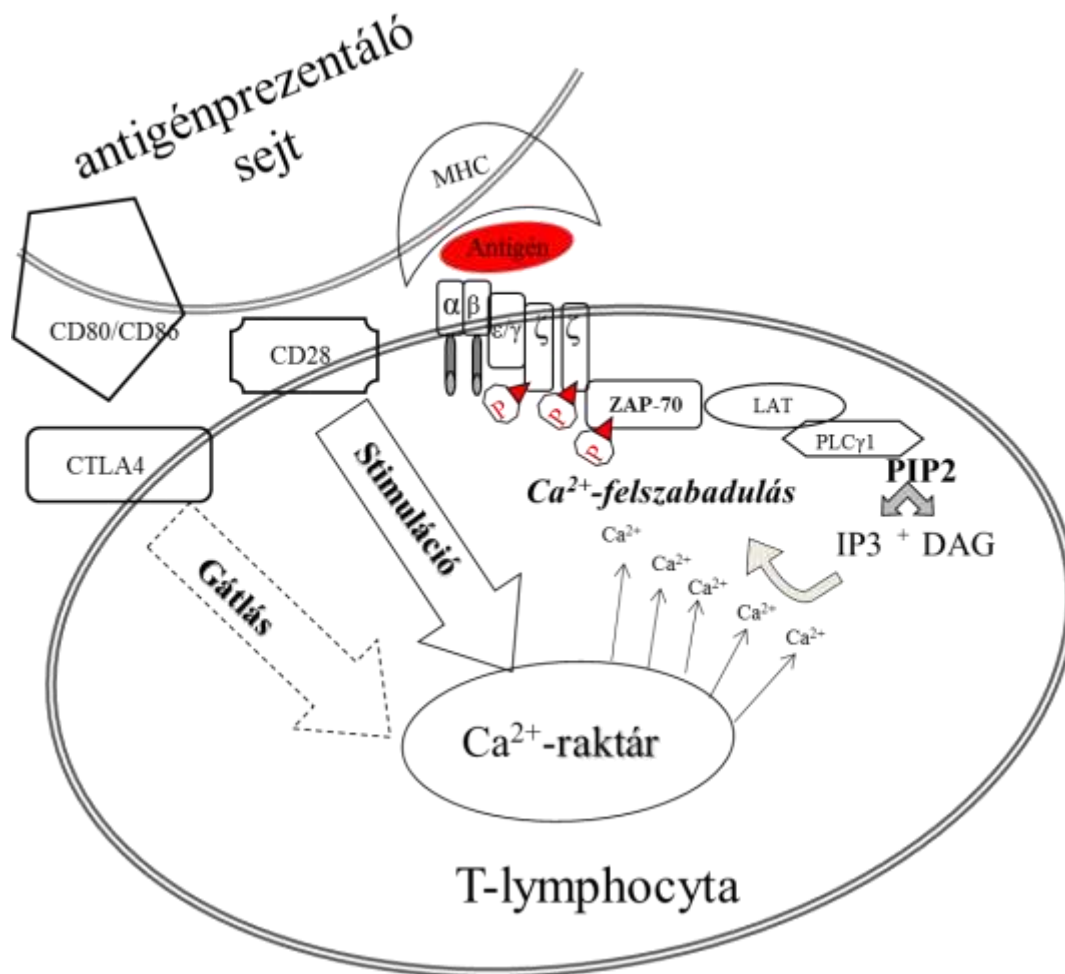
A sejtek közötti kommunikációban alapvető a citokinek és a kemokinek szerepe. A citokinek egy csoportja gyulladást fokozó vagy proinflammatorikus hatású, így a tumornekrozis factor (TNF)- α , az α -interferon (IFN- α), az interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-15, IL-17, IL-18, IL-32 hozzájárul a gyulladáshoz. Az antiinflammatorikus citokinek (IL-10, IL-35) mérséklék a gyulladást. A citokinek komplex hálózata biztosítja az immunrendszernek a szervezet aktuális állapotához igazodó aktivációját. Szisztémás autoimmun kórképekben, így RA-ban és SLE-ben is jellemző a proinflammatorikus citokinek arányának növekedése [16, 28]. A hálózat minden eleme eltérő mértékben játszik szerepet a gyulladás kialakulásában, RA-ban az IL-1, IL-6, IL-17 és a TNF- α , míg SLE-ben az IL-6, IL-17 és az IFN- α szerepe a leginkább meghatározó. A kemokinek szabályozzák a lymphoid sejtek érpályából történő kilépését, a gyulladás helyére történő vándorlását és aktiválását. A cisztein helyzete alapján megkülönböztetünk CC, CXC, XC és CX3C kemokineket.

3.2.4.3. T-lymphocyták

A szisztémás autoimmun betegségek patomechanizmusában központi szerepet játszanak a T-lymphocyták. Az adaptív immunválasz sejtjei, felszínükön antigénprezentáló sejtek (APC) által feldolgozott és MHC1 vagy MHC2 molekulával együtt bemutatott peptideket felismerő T-sejt-receptort (TCR) hordoznak. A helper T-lymphocyták (Th, CD4+) szabályozó funkciókat töltenek be, a citotoxikus T-lymphocyták (Tc, CD8+) effektor funkcióval rendelkeznek. Fejlődésük a thymusban zajlik, ennek során elpusztulnak azok a sejtek, amelyek nem tudnak a saját MHC-vel együttműködni és azok, amelyek nagy affinitással reagálnak a saját antigénnel (**centrális tolerancia, lásd 3.1 fejezet**). A CD4+ T-sejtek MHCII-vel bemutatott idegen peptideket, a CD8+ T-sejtek MHCI molekulával bemutatott saját peptideket ismernek fel. Megkülönböztetünk $\alpha\beta$ és $\gamma\delta$ T-sejteket a TCR szerkezete alapján, a perifériás T-lymphocyták mintegy 2 százaléka $\gamma\delta$ T-sejt, 98 százaléka $\alpha\beta$ T-sejt.

A Th-sejteket számos csoportra oszthatjuk. A Th1-sejtek elsősorban TNF- α -t, IFN- γ -t, IL-2-t és IL-12-t termelnek, transzkripciós faktoruk a T-bet és a STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4) [35, 36]. A Th2-sejtek IL4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 és IL-13 citokineket termelnek, transzkripciós faktoruk a GATA 3 és a STAT 6 [35]. A Th9-sejtek

jellemző citokinje az IL-9, szerepük van a fégfertözések elleni védekezésben [37]. Proinflammatorikus hatású IL-17 és IL-22 citokineket termelnek a Th17-sejtek [38], jellemző transzkripciós faktoruk a ROR γ t [35], a fokozott IL-17-termelésnek szerepe van az RA és az SLE patogenezisében. A Th22-sejteknek főként az epidermalis immunitásban és remodellingben van szerepe, IL22 és TNF- α a jellemző citokinjük [39]. A B-lymphocytá-aktiválásban alapvető szerepük van a follicularis Th-sejteknek [40]. Az antigénprezentáló sejt (APC) által prezentált peptid/MHC komplex és a TCR kapcsolódása T-lymphocytá-aktivációhoz vezethet. A T-lymphocytákon kifejeződő CD28 és az APC-n kifejeződő CD80/CD86 kapcsolódása (kostimuláció) is szükséges a T-lymphocytá-aktivációhoz. A T-lymphocyták túlzott aktiváció esetén citotoxikus T-lymphocytá antigén (CTLA4) -proteint expresszálnak, mely a CD80/CD86-hoz a CD28-nál nagyobb affinitással kötődik és gátló hatása van a sejtaktivációra (koinhibíció, **4. ábra, T-lymphocytá-aktiváció**). Az abatacept (CTLA4 immunglobulin fúziós protein) az APC CD80/CD86 receptorát elfoglalva gátolja a kostimulációt, hatékony immunszuppresszív gyógyszer. *In vitro* kísérletek során T-sejtek stimulálhatóak fitohemagglutinin- (PHA), concavalin A- (ConA) és anti-CD3/CD28-kezeléssel.



4. ábra. T-lymphocyta-aktiváció. Autoimmun betegségek patomechanizmusa (Nagy Gy. könyvfejezet, In: Szekanecz Z. Reumatológia: egyetemi jegyzet). A TCR kapcsolódása az APC/MHC2/peptid komplexéhez ITAM-szekvenciák foszforilációját és protein tirozinkinázok aktivációját eredményezi. A ZAP-70 foszforilálódik, majd a linker for activation of T cells (LAT) adaptor fehérjén keresztül a foszfolipáz C- γ 1 (PLC- γ 1) is aktiválódik. A foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát inozitol-1,4,5-trifoszfátra (IP3) és diacilglicerolra (DAG) hasad. Az IP3 a belső raktárakból Ca^{2+} -ot szabadít fel, mely az aktivációt követően másodperceken belül Ca^{2+} -szignált eredményez, a DAG proteinkináz C-t aktivál (PKC) [4].

A regulátor vagy szabályozó T-sejtek (Treg) immunszuppresszív hatásúak, a Treg sejtek által termelt fontosabb antiinflammatorikus citokinek a TGF- β , IL-10 és IL-35, jellemző transzkripciós faktoruk a FOXP3 [41]. A többi CD4 T-lymphocytától eltérően a Treg sejtek folyamatosan expresszálják a CTLA4-et, gátolják T-lymphocyta-proliferációt, alapvető

szerepük van a perifériás tolerancia fenntartásában (lásd **3.1. fejezet**). SLE-ben [42] és RA-ban [16] is leírták a Treg sejtek funkcionális zavarát, a Th1 és a Th17 lymphocyták által termelt proinflammatorikus citokinek központi szerepet játszanak a synovialis gyulladásban RA-ban [17].

A TCR-hez nem kovalens módon kapcsolódnak a CD3 komplex $\gamma\epsilon\delta\zeta$ -láncai, a jelátvitelért az intracelluláris IgR family tyrosine based activation motif (ITAM) szekvenciák felelősek. A CD3 γ , ϵ és δ -láncok 1-1, míg a ζ láncok 3 ITAM szekvenciát tartalmaznak, ez is mutatja a ζ -lánc alapvető szerepét a T-sejt-jelátvitelben. Az Src-Like Adaptor Protein (SLAP) génkiütött állat thymocitáinak a ζ -lánc kifejeződése fokozott, a SLAP degradációra irányíthatja a CD3- ζ láncot [43]. Az aktivációs folyamat első lépése ITAM tirozinok foszforilálódása, ezt követi számos további intracelluláris fehérje foszforilálódása protein tirozinkinázok és szerinkinázok aktivációján keresztül, majd a citoplazmatikus Ca^{2+} -szignál, mely T-lymphocyt-aktivációhoz és klonális expanzióhoz vezet (**4. ábra, T-lymphocyt-aktiváció**).

A T-lymphocyt-aktiváció során reaktív oxigén-intermedier (ROI) és nitrogén-monoxid (NO) -termelés is történik. RA-ban és SLE-ben a T-lymphocyt-aktiváció számos részfolyamatának defektusát leírták. A humán RA-hoz hasonló arthritishez vezet egerekben a T-lymphocyt jelátvitelben központi szerepet játszó ζ associated protein (ZAP-70) spontán pontmutációja [44]. A T-lymphocyták RA-ban betöltött szerepét igazolja az abatacept hatékonysága [16]. SLE-ben az egyik legtöbbet vizsgált eltérés a csökkent ζ -lánc-expresszió [45]. A mitokondriális membránpotenciál ($\text{MMP}/\Delta\Psi_m$) elengedhetetlen a mitokondrium bioenergetikai funkcióihoz, összeomlása után az apoptózis folyamata irreverzibilis. A mitokondriális potenciál összeomlását megelőzi a mitokondriális hiperpolarizáció (MHP) [46]. Tartósan magasabb mitokondriális potenciál mérhető SLE-s betegek T-lymphocytáiban [47, 48].

A T-sejtek szerepe alapvető az aggregán indukálta arthritis modellben. A chondrocyták által termelt porc proteoglikán aggregán a II. típusú kollagén mellett a hyalinporc extracelluláris mátrixának fő alkotója. A proteoglikán aggregán molekulák hialuronsavlánchoz kapcsolódva megkötik a II. típusú kollagénszálakat. A proteoglikán indukált arthritisben (PGIA, *proteoglycan induced arthritis*), genetikailag érzékeny egerekben (BALB/c, C3H) humán porc aggregán proteoglikán oltásával krónikus, progresszív polyarthritis váltható ki. A CD4

T-sejt hibridóma (5/4E8), mely a P70-84 peptidszekvenciával reagál, BALB/c egérben arthritist vált ki [49]. A P70-84 epitóra specifikus transzgénikus egér fokozottan érzékeny a proteoglikán indukálta arthritisre [50]. Igazolták GP-39 porcproteinre, II-es típusú kollagénnre, és citrullinált proteinekre specifikus autoreaktív T-sejtek jelenlétét is RA-ban [16]. Az autoreaktív T-lymphocyták központi szerepet játszanak az SLE-re jellemző poliklonális B-sejt-aktivációban [51].

3.2.4.4. B-lymphocyták

A B-lymphocyták az adaptív immunválasz sejtjei, receptoruk (BCR) sejtfelszíni immunglobulin (IgD, IgM), ehhez kötődhet specifikusan az antigén, amely felvételt majd feldolgozást követően MHC II-vel bemutatásra kerül a T-lymphocytáknak. A fent említett follicularis Th- és Th2-sejteknek alapvető szerepük van a B-lymphocyták stimulálásában. Eltérően a monocytáktól és a dendritikus sejtektől a B-lymphocyták olyan antigéneket vesznek fel, amelyekre sejtfelszíni receptoruk specifikus, ugyanakkor igen alacsony antigén-koncentráció is stimulálhatja a B-sejteket. A B-sejtek jelentős mennyiségű citokint is termelnek. A B-lymphocyták Treg-sejtekhez hasonló csoportja, a szabályozó B-sejtek (Breg), immunszuppresszív hatásúak, jellemző citokinjük az IL-10 [52, 53]. Az RA patomechanizmusában a B-sejtek alapvető szerepét igazolja a CD20 elleni monoklonális antitest (rituximab) hatékonysága. RA-ban és SLE-ben is fokozott a B-lymphocyta-stimulátor (B lymphocyte stimulator, BLYS) termelődése. Magas anti-DNS- és immunkomplexszinttel járó lupus szerű betegség alakul ki BLYS transzgenikus állatban [54], a BLYS-gátló belimumab törzskönyvezett gyógyszer SLE-ben. A B-lymphocyták 90 százaléka nagy affinitású immunglobulinokat termelő B2-sejt, míg körülbelül 10 százaléka a **3.1. fejezetben** említett természetes antitesteket termelő CD5+ B1 B-sejt. A BRC-antigénkötődés ITAM-szekvenciákon keresztül a T-lymphocytákhoz hasonlóan fehérjék tirozinfoszforilációját és Ca^{2+} -szignált eredményez. RA-ra és SLE-re is jellemző az autoantitest-termelés, lásd erről a **3.2.3.1.** és a **3.2.3.2.** fejezeteket, a legnagyobb számú autoantigén (proteinek, nukleinsavak, szénhidrátok, lipidek) ellen SLE-ben figyelhető meg autoantitest-termelés. Az autoantitestek antigénekkkel kapcsolódva immunkomplexet képezhetnek, amelyek központi szerepet játszanak az SLE patomechanizmusában [8].

3.2.4.5. Monocyta, dendritikus sejtek

Hatékony APC-k a monocyták, szöveti formáik a makrofágok és a dendritikus sejtek [55]. RA-ban a synovialis makrofágok a gyulladást fokozó citokinek egyik fő forrását képezik [16, 17]. A dendritikus sejtek monocytákból differenciálódhatnak, granulocita-macrophage kolóniastimuláló faktor (GM-CSF) és IL-4 jelenlétében [56]. Az IFN- α szérum szintje magasabb SLE-s betegekben, mint egészséges kontrollokban, az IFN- α fokozza a monocyták dendritikus sejté történő differenciálódását [57]. A dendritikus sejtek autoantigéneket prezentálhatnak, melynek szerepe lehet a betegség patomechanizmusában.

3.2.4.6. Az extracelluláris vesiculák

Az extracelluláris vesiculák (EV) a sejtek újonnan felfedezett hírvivői, számos fiziológiai és patológiai folyamatban igazolták szerepüket. Csak néhány példát említve az EV-k nukleinsavakat, fehérjéket szállíthatnak, antigéneket prezentálhatnak, befolyásolhatják a daganatok növekedését és a metasztázisképződést, patogenetikai tényezők lehetnek szisztémás autoimmun kórképekben [58, 59, 60]. Keletkezésük mechanizmusa és méretük alapján három fő csoportra oszthatóak: exosomák, microparticulák vagy microvesiculák (MV) és apoptotikus testek. Az exosomák a legtöbbet vizsgált EV-csoport, méretük 50–100 nm, a multivesicularis testek (MVB) exocytosisával jönnek létre, endoszomális markereket hordoznak. Az MV-k mérete 100–1000 nm, felszínükön az őket termelő sejt citoplazmatikus markereit és jellemzően foszfatidil-szerint hordoznak, de leírtak foszfatidil-szerint nem hordozó MV-t is. Az apoptotikus testek mérete 1–5 μ m, a programozott sejthalál során jönnek létre, DNS-t tartalmaznak. Kevés az EV-k vizsgálatára beállított és elfogadott laboratóriumi módszer, a különböző méretű EV-k mérettartománya és tulajdonságai hasonlóak számos biológiai mintákban előforduló struktúrákhoz, például immunkomplexekhez, vírusokhoz, baktériumokhoz, mely jelentősen nehezíti vizsgálatukat. RA-ban [61, 62] és SLE-ben [63, 64] is több kutatócsoport vizsgálta az EV-k potenciális szerepét.

3.2.4.7. A nitrogén-monoxid és a hisztamin

A nitrogén-monoxid (NO) nagyszámú fiziológiai és patológiai folyamatban szerepet játszó molekula [65], legjobban ismert funkciója a napi klinikai gyakorlatban is alkalmazott értónus-szabályozó hatása, számos értágító gyógyszer NO-emittáló. Az NO féléletideje rövid,

szuperoxiddal (O_2^-) erélyes oxidáló hatású peroxinitritet ($ONOO^-$) képezhet, mely átalakulhat stabil, az NO-termeléssel arányos mennyiségben szintetizálódó nitritté (NO_2^-) és nitráttá (NO_3^-) [66]. NO-szintetáz (NOS) enzimek L-argininből NO-t szintetizálnak, NOS izoformák az endothelialis NOS (eNOS), a neuronális NOS (nNOS) és az indukálható NOS (iNOS).

A gyulladást is szabályozza az NO számos mechanizmussal [67], különösen iNOS fejeződik ki nagy mennyiségben a gyulladásos szövetekben. Az apoptózis folyamata befolyásolható NO-val, amely proapoptotikus és antiapoptotikus hatásokkal is rendelkezik [68] és számos ponton szabályozza a mitokondrium működését. Alacsony koncentrációban reverzibilisen (az oxigénnel versengve) és specifikusan gátolja a citokróm-oxidázt mely adenosin-trifoszfát- (ATP) deplécióhoz vezet. A peroxinitrit ugyanakkor irreverzibilisen gátolja a mitokondriális légzést, oxidálva a légzési lánc komponenseit [69, 70]. Az NO mitokondrium-bioszintézist indukál ciklikus guanozin-monofoszfát- (cGMP) függő peroxiszómaproliferátor λ receptor 1α -n (PGC- 1α) keresztül, barna zsírsejtek, U937-sejtek, HeLa-sejtek mitokondrium-bioszintézise indukálható NO-val [71]. Mind RA-ban [72, 73], mind SLE-ben [74] jelentősen fokozott NO-termelésről számoltak be.

A hisztamin (β -imidazolil-etilamin) a gyulladás szabályozásában meghatározó szerepet játszó biogén aminos, termelődésének helyén növeli a kapillárisok permeabilitását, proinflammatorikus hatású. Hatásait H1-, H2-, H3- és H4-receptorokon keresztül fejti ki, a jelátvitel a H1-receptor esetében a foszfolipáz C (PLC) -aktiváció és Ca^{2+} -szignál, míg a H2-, H3- és H4-receptorok esetén ciklikus AMP (cAMP) szignálútvonalon keresztül történik [75, 76, 77], T-lymphocytákon a H1-, H2- és H4-receptor fejeződik ki [78, 79]. A hisztamin L-hisztidinből keletkezik, bioszintézisét a hisztidin-dekarboxiláz enzim (HDC) végzi, a HDC enzim legnagyobb mértékben a hízósejtekben és bazofil granulocytákban expresszálódik. Irodalmi adatok alapján a hisztaminnak szerepe lehet az RA és az SLE patomechanizmusában [80]. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a hisztaminhiány a citokinháztartás Th1 irányú eltolódásával jár [81, 82].

3.2.4.8. A komplementrendszer

A komplementrendszer limitált proteolízissal aktiválódó molekulák kaszkádja, mely több effektor funkcióval rendelkezik, mint például a kórokozó molekulák lízise, kemotaktikus

hatás és opszonizáció [83]. A komplementrendszer az alternatív úton, a klasszikus úton és a lektinindukált úton aktiválódhat. A klasszikus utat elsősorban immunkomplexek, az alternatív és a lektinindukált utat baktériumok és vírusok aktiválhatják. SLE-ben a nagy mennyiségben termelődő antitestek immunkomplexeket alkotnak antigénjeikkel és komplement faktorokkal, ami a komplementrendszer aktiválódásához vezet [84]. Korábbi eredményeink alapján a C3, C4 és az összhemolitikus aktivitás értékénél az alternatív konvertáz [C3b(Bb)P] jobb korrelációt mutat az SLE klinikai aktivitásával [85]. Fokozott immunkomplex-képződés és következményes komplementaktiváció RA-ban is jellemző [86]. A keringő immunkomplexek citrullinált fibrinogént tartalmazhatnak és hozzájárulhatnak a synovitis kialakulásához RA-ban [87].

3.2.5. A gyulladás késői következményei

RA-ban és SLE-ben is strukturális és funkcionális károsodáshoz vezethet a tartósan fennálló gyulladás, a károsodás mértéke mindkét betegségben jelentősen eltér az egyes betegekben, és korrelál a genetikai, szerológiai és prognosztikai tényezőkkel, illetve a betegség aktivitásával [16, 17, 28]. RA-ban a synovialis gyulladás osteoclast-differenciálódáshoz és -aktivációhoz, a fokozott osteoclasttevékenység eróziók kialakulásához vezet. A betegségre jellemző az ízületi struktúrák, a porc, a porcközeli csont károsodása, ízületi deformitások és subluxatiók kialakulása. Az SLE szinte minden szervet megbetegíthet, a gyakori vese- és központi idegrendszeri érintettség miatt funkcionális és strukturális károsodás kialakulása.

3.2.6. Hasonlóságok és különbségek az RA és az SLE patogenezisében, klinikai képében és kezelésében

Az RA és az SLE szisztémás autoimmun betegségek, melyek patogenezisében, klinikai képében és kezelésében markáns különbségek mellett számos hasonlóság is található, előfordul mindkét kórkép jellemzőit mutató betegség is. Ebben a fejezetben a két kórképre jellemző néhány hasonlóságot és különbséget tárgyalunk.

A relapsusokban és remissziók formájában zajló klinikai aktivitás az SLE-re jellemző. Az RA-ra és az SLE-re is jellemző a női dominancia, a nő/férfi arány 9/1 SLE-ben, 3/1 RA-ban [88, 89]. Az SLE gyakorisága jelentős etnikai különbségeket mutat, az USA-ban végzett

vizsgálatok alapján fekete bőrű nőkben gyakrabban alakul ki a betegség, mint fehér bőrű nőkben, ugyanakkor az RA gyakorisága hasonló feketékben és fehérekben [90, 91].

A nem MHC gének között a STAT 4 gén harmadik intronjának SNP haplotípusa mindkét betegséggel asszociál [92]. Szintén mindkét betegségre hajlamosít a PTPN22R620W polimorfizmus [93] és a tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3) gén egyes polimorfizmusai is [94, 95, 96]. A közös genetikai rizikófaktorok mellett számos különbség is van a két betegség genetikai hátterében [97, 98]. A HLA gének közül a DRB1*0101, DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0901 RA-ra, míg a DRB1*0301, DRB1*0501, DRB1*0801, DRB1*1501 SLE-re hajlamosít [99, 100, 101]. Epigenetikai tényezők közül a DNS-hipometilációt mindkét betegségben leírták [102, 103, 104].

Az EBV-fertőzés mindkét betegség kialakulásában szerepet játszhat [105, 106], a parvovírus B19-fertőzésnek az RA patogenezisében lehet szerepe [107]. A dohányzás mindkét kórképre hajlamosít [12, 108]. Az UV-fény bőr- és szisztémás tüneteket provokáló hatása jól ismert SLE-ben [8]. Mindkét betegségre jellemző a gyulladást fokozó citokinek fokozott termelődése, különösen a gyulladás helyszínén, amely az egészséges kontrollokénál magasabb citokin-szérumszinthez is vezethet. RA-ban különösen az IL-1, IL-15; IL-18, IL-32, TNF- α , RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand), GM-CSF, lupusban elsősorban az IL-21, IL-23, BlyS és az α -interferon szerepe meghatározó, mindkét kórképre jellemző a fokozott IL-6- és IL-17-termelődés. A TNF- α termelődése mindkét betegségben fokozott [16, 17, 109]. Míg a TNF- α blokkolása RA-ban hatékony terápiás lehetőség, paradox módon a TNF- α -blokkoló biológiai terápiák SLE-t indukálhatnak.

Az SLE szinte minden szervet megbetegíthet, gyakori a bőr-, ízületi, vese-, központi idegrendszeri és haematológiai érintettség. RA-ban az ízületi gyulladás a legjellegzetesebb, de a betegség járhat többek között máj-, tüdő- és szemészeti érintettséggel is. Mindkét betegség társulhat vasculitissel, pericarditisszel, Sjögren-szindrómával és antifoszfolipid szindrómával [8, 17, 110]. Az ízületi gyulladás RA-ban eróziók és következményes destrukció kialakulásával jár, míg SLE-re a nem erozív arthritis jellemző. Az SLE-s betegek egy csoportjában erozív arthritis alakul ki, gyakoribb az RF- és ACPA-pozitivitás, mint a nem erozív arthritises SLE-s betegekben, és többnyire enyhébbek a lupus egyéb szervi manifesztációi. Ez a betegcsoport átmenetet képez a két betegség között és rhupusként is szokás emlegetni [111, 112].

A B-lymphocyták aktivációja, autoantitestek termelése, fokozott immunkomplex-képződés és következményes komplementaktiváció mindkét betegségre jellemző [85, 113]. Az RF RA-ban a betegek 60-80 százalékában kimutatható, az SLE-s betegek mintegy 20 százaléka szintén RF-pozitív [114]. Az RF- és anti-ACPA-szintek nem mutatnak összefüggést az RA aktivitásával, míg az anti-DNS antitest titere SLE-ben többnyire korrelál a betegség aktivitásával [8, 17, 32, 85]. A B-lymphocyta-depletáló rituximab RA-ban igen hatékony gyógyszer. SLE-ben a rituximab nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, ugyanakkor a betegek egy részénél hatékony (*off label igényelhető*) terápiás lehetőség [115]. A BlyS-blokkoló belimumab az SLE-ben törzskönyvezett első biológiai terápia, klinikai vizsgálatok alapján RA-ban is hatékony lehet [116].

4. Célkitűzések

Kísérleteink célja az RA és az SLE patomechanizmusának vizsgálata volt. Törekedtünk mindkét szisztémás autoimmun kórkép kialakulásához vezető tényezők és az effektor mechanizmusok szabályozásának jobb megértését célzó kísérletek elvégzésére.

I: Természetes autoantitestek vizsgálata RA-ban

II: Genetikai polimorfizmusok tanulmányozása

III: A citrullináció szerepének vizsgálata a tolerancia elvesztésében; citrullinált proteinek elleni antitestek specificitásának és antigénkötésének vizsgálata

IV: C1-inhibitor elleni antitestek SLE-ben

V: Az NO szerepének vizsgálata a T-lymphocyta-aktivációban

VI: A CD3- ζ -expresszió szabályozásának vizsgálata

VII: A glikozidázok szerepének vizsgálata RA-ban

VIII: Extracelluláris vesiculák karakterizálása és vizsgálata

5. Módszerek

Ebben a részben röviden jellemzésre és bemutatásra kerülnek a felhasznált biológiai minták és a kísérletek során alkalmazott fontosabb módszerek. Az értekezésben a terjedelmi korlátok miatt nem részletezett betegadatok, az állatkísérletek során használt minták jellemzői, a módszerek és referenciák az egyes közleményekben megtalálhatóak.

5.1. Betegek és kontrollok

Munkánk során RA-s, SLE-s, juvenilis idiopathiás arthritisben (JIA) szenvedő, tüdőrákos és arthrosisos betegek és kontrollok mintáit vizsgáltuk, a megfelelő klasszifikációs kritériumokat alkalmaztuk [20, 117, 118, 119]. A citrullináció immunogenitásának vizsgálata során rögzítettük a betegek dohányzási szokásait (csomagév = napi cigarettaszám x dohányos évek száma/20), nem dohányosnak tekintettük azokat a betegeket és kontrollokat, akik korábban sem dohányoztak [120]. A vizsgálatokhoz szükséges etikai engedélyekkel rendelkezünk, a betegek minden esetben aláírták a vizsgálatokra vonatkozó beleegyező nyilatkozatot.

5.2. T-lymphocyta- és fibroblastszeparálás és sejtkultúra

5.2.1. T-lymphocyta

A perifériás vérből Ficoll-Histopaque (Sigma Aldrich St. Louis, USA) centrifugálással perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC)-t izoláltunk [121, 122, 123, 124]. A sejteket, sejtvonalakat CO₂-termosztátban (5% CO₂) 37 °C-on tartottuk. Jurkat T-sejteket, frissen szeparált PBMC-sejteket és mágneses sejtszeparálás módszerével tisztított (Miltényi Biotech, Bergisch Gladbach, Németország) CD4 T-lymphocytákat vizsgáltunk [124, 125]. A CD4 T-lymphocyta-szeparálás során nyert sejtek legalább 90 százaléka CD4⁺ sejt volt, amit áramlási citometriával ellenőriztünk (lásd 5.5. fejezet). A Jurkat-sejteket, PBMC-sejteket és a CD4 T-lymphocytákat (ATCC E6.1, Manassas, Virginia, USA) RPMI 1640 (Sigma), 10% FBS (foetal bovine szérum, Sigma), 2 mM glutamint tartalmazó tápoldatban (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) tartottuk, a sejtkultúrák denzitása 1×10⁶ sejt/ml volt. A sejtek életképességét a kísérletek előtt tripánkék-festéssel ellenőriztük (az életképesség ellenőrzéséről lásd az 5.5.1. fejezetet is). A sejtek stimulálása fitohemagglutininnel (PHA, Sigma), concavalin A-val (ConA, Sigma), anti-CD3/CD28-kezeléssel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) vagy anti-CD3/CD28-konjugált gyöngyök alkalmazásával (Life

Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) történt. Egyes kísérletek során lizoszómagátlót (NH_4Cl , 10 mM, Sigma-Aldrich) vagy proteaszómagátlót (MG-132, 100 nM, Calbiochem, San Diego, CA, USA) alkalmaztunk. A T-lymphocytákat egérlép-szuszpenzióból negatív szelekcióval, mágneses gyöngyökkel (Miltenyi Biotech) szeparáltuk.

5.2.2. Fibroblast

A synovialis fibroblastokat (SF) térdprotézis-műtéten vagy térdartroszkópián átesett betegek synovialismembrán (SM) -mintáiból nyertük. *Neidhart et al.* által leírt módon izoláltuk az SF sejttörzseket [126]. Az 1 mm³-es darabokra vágott SM szövetdarabokat, Dispase II jelenlétében (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) emésztettük, az így kapott sejtuszuszenziót szűrtük, majd a sejteket Dulbecco's modified Eagle's medium-ban (DMEM, Sigma) tenyésztettük, 10% FCS (foetal calf serum, Gibco-BRL, Paisley, USA) és 2 mM glutamint tartalmazó tápoldatban. Az SF sejt kultúrákat 4-9. passzálsig tenyésztettük, a kultúrák makrofágmentességét a CD68- (anti-human CD68-FITC, eBioScience Inc, San Diego, CA, USA) festődés hiánya igazolta [127, 128, 129].

5.3. NO- és ROI-kezelés és -gátlás

Az NO hatásainak vizsgálatához az NO-donor (Z)-1-[2-(2-aminoetil)-N-(2-ammonioetil) amino]diazen-1-ium-1,2-diolát dietiléntriamint (NOC-18) (Sigma), az NO-donor nátrium-nitroprusszid (Sigma), a NOS-gátló szerek (7-nitronidazolid; NG-mono-metil-L-arginin) és az NO-kelátor karboxi-2-fenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazolin-1-oxid-3-oxid (C-PTIO) (Sigma) alkalmazásával történt [121, 122, 125]. ROI-donorként hidrogén-peroxidot, a ROI-szignál gátlására szuperoxid-dizmutáz-mimikálót (superoxide dismutase mimic manganese III tetrakis 4-benzoic acid porphyrin chloride) (MnTBAP) alkalmaztunk.

5.4. Állatmodellek

5.4.1. Hisztidin-dekarboxiláz génkiütött (HDC-KO) állat

Az NO és a hisztamin immunmoduláns hatását HDC génkiütött egéren és vad típusú egéren vizsgáltuk [125, 130]. A HDC-KO egértörzset [131] kilenc generáción keresztül kereszteztük

BALB/C egértörzsbe, az állatokat intézetünk állatházában tartottuk. Kísérleteinkhez 8-10 hetes HDC-KO és vad típusú hím egerek lépéből izolált sejteket használtunk. Az állatok hisztaminmentes tápot (Altromin GmbH., Németország) kaptak. Egyes kísérletek során az állatokat komplett Freund-adjuvánssal (CFA) oltottuk.

5.4.2. Aggrekán indukálta arthritis

Humán porcából előállított proteoglikán aggrekánnal intraperitonealisan immunizáltunk vad típusú BALB/c és HDC-KO egereket (0, 21. és a 42. napon) a korábban leírt protokollnak megfelelően [132]. A második vagy a harmadik, aggrekánnal történő immunizációt követően 10-14 nappal az állatokban progresszív polyarthritis alakul ki [130], amelyet az arthritis-pontszám (score) alapján értékeltünk. Az aggrekán immundomináns epitop citrullinációjának immunmoduláns hatását BALB/c egéren vizsgáltuk [133]. A proteoglikán aggrekán T-sejt-receptor transzgenikus (PG-TCR TG) BALB/c egeret [133] a Rush Egyetem állatházában (Comparative Research Center, Chicago, IL, USA) tartottuk.

5.5. Áramlási citometria

5.5.1. A mérésekhez használt készülékek, a mérések értékelése, a sejtek életképességének és a sejtproliferációnak a mérése

A méréseket BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), BD FACStarPlus és BD LSRII áramlási citométerekkel végeztük, az eredményeket BD CellQuest, FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA) és WinMDI (La Jolla, CA, USA) programok alkalmazásával értékeltük [121, 122, 123, 124, 125]. A nem kinetikus, sejteken történt vizsgálatok során 10 000 sejtet mértünk, a mérések beállításánál egyes esetekben izotípus kontrollokat használtunk. Az egyes kísérletek során használt antitestek részletes adatai az értekezéshez kapcsolódó közleményekben megtalálhatóak. A sejtek életképességének meghatározása annexin-fluorokróm és propidium-jodid (PI) fluoreszcens festékekkel történt. A sejtproliferáció mérése karboxifluorescein-szukcinimidil-észter (CFSE) festék alkalmazásával történt.

5.5.2. Citoplazmatikus és mitokondriális Ca^{2+} -mérés és Ca^{2+} -kelálás

Az intracelluláris Ca^{2+} -szint mérése lipidoldékony fluo-3- és fluo-4-acetoximetilészter (AM) (Molecular Probes, OR, USA) alkalmazásával történt, a mérések beállításához ionomicint és thapsigargin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk [121, 122, 123, 124]. Kinetikus Ca^{2+} -szignál-mérések során a stimulációt követően 10-15 perc volt a mérési idő [122, 125]. A Ca^{2+} -kelálás 1,2-bisz(o-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav-AM (BAPTA-AM) kezeléssel történt. Egyes kísérletekben IP3-receptor-blokkoló 2-aminoetoxi-difenil boránt (2-APB) használtunk. A mitokondriális Ca^{2+} -szintet xanthylum, 9-[4-[bisz[2-[(acetiloxi)metoxi]-2-oxoetil] amino]-3-[2-[2-[bisz[2-[(acetiloxi)metoxi]-2-oxoetil] amino]fenoxi]etoxi]fenil]-3,6-bisz(dimetilamino)-bromid (Rhod2) felhasználásával mértük.

5.5.3. Mitokondriális membránpotenciál és mitokondrium mennyiség mérése

A mitokondriális membránpotenciált ($\Delta\psi_m$) lipidoldékony, kationos, szelektíven a mitokondriumokhoz kötődő fluoreszcens festékekkel: tetrametilrhodamin-metilészter-perkloráttal (TMRM), 3,3-dihexiloxakarbocianin-jodiddal (DiOC6,) és 5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetil benzimidazolokarbocianin-jodiddal (JC-1) (Molecular probes) mértük. A mitokondrium mennyiség mérése nonyl acridine orange (NAO) és mitotracker green (MTG) (Molecular Probes), membránpotenciáltól független fluoreszcens festékekkel történt [121, 122, 123].

5.5.4. NO- és ROI-mérés

Az NO mérése lipidoldékony 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein-diacetát (DAF-FM) (Molecular probes) alkalmazásával történt. A ROI-termelést az oxidációra érzékeny fluoreszcens festék hidroetidinnel (HE) (Molecular Probes) mértük [121, 122, 123, 125].

5.5.5. Extracelluláris vesiculák mérése

Az extracelluláris vesiculák mérése az általunk beállított, különböző méretű gyöngyök alkalmazásával kalibrált áramlási citometriás módszerrel történt, a 200-300 nm-nél nagyobb

méretű struktúrák megbízhatóan mérhetőek ezzel a módszerrel. Azokat a jeleket tekintettük vesicularis eredetűnek, amelyek a vesiculakapun belül találhatók és markerrel megjelölhetők. A mérések beállításánál törekedtünk a legjobb jel/zaj arány elérésére, a biológiai mintákat 0,1 µm-es filterrel szűrt fiziológiás sóoldatban vagy PBS-ben hígítottuk. Az immunkomplexek detektálása anti-humán IgG-FITC (1:300) és anti-humán IgM-FITC (1:150) felhasználásával történt [128, 129, 134, 135].

5.6. Konfokális mikroszkópia

A sejteket mosást követően BD Cell-Tak (BD) oldatban vettük fel és sejttenyésztő edényben (BD) inkubáltuk. Ezt követően Cytofix/Cytoperm (BD) oldattal és a megfelelő primer és szekunder antitestekkel kezeltük és mostuk a mintákat Perm/Wash (BD) oldattal. FluoView 500 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal (Olympus, Hamburg, Németország) készítettük a felvételeket, magas numerikusapertúra-beállítás mellett [124]. Egyes kísérletek során a sejtmembránt koleratoxin (CTX) Alexa488-cal (BD), a sejtmagot Draq5 (BD) festéssel jelöltük. A mérések értékelése FluoView 5.0 (Olympus, Hamburg, Németország) software alkalmazásával történt, a kolokalizációs vizsgálatok során az ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) software-t használtuk. A lizoszómajelölés LysoTracker (Molecular Probes) vagy lysosome associated membrane Protein 1-PE (LAMP1-PE) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) alkalmazásával történt. A CD3-ζ festéséhez az antitestet fluoreszcensen jelöltük Mix-n-Stain CF Dye Ab Labeling Kit CF488A (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) felhasználásával.

5.7. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM), atomerő mikroszkópia (AFM)

5.7.1. TEM

A lymphocyták mitokondriumainak szerkezetét TEM módszerrel vizsgáltuk (Tecnai BioTWIN 12, FEI, Hillsboro, USA) [122]. A vesiculák mértének és szerkezetének vizsgálata szintén TEM módszerrel Hitachi 7100 (Tokio, Japán) történt [134]. A TEM vizsgálatok során izoláltuk a microvesiculákat, majd 4%-os paraformaldehidet (PFA) mértünk a mintákra. Inkubálást követően kimostuk a PFA-t és 1% ozmium-tetraoxidot (Taab, Berks, Egyesült Királyság) adtunk a mintákhoz, majd mosást és dehidrált követően a mintákat Taab 812 gyantába ágyaztuk be. Az immunkomplexeket immun-TEM módszerrel vizsgáltuk, melynek során a mintákat peroxidázzal konjugált anti-humán IgG és anti-humán IgM (Sigma-Aldrich)

felhasználásával jelöltük meg. ImageJ képelemző alkalmazásával analizáltuk a TEM-képeket (ImageJ 1.42q Wayne Rasband, MA, USA).

5.7.2. AFM

A microvesiculákat AFM módszerrel is vizsgáltuk, a módszer a vesiculák méretének és felszínének vizsgálatára alkalmas. Az AFM-et (PSIA, Liestal, Svájc, sorozatszám: XE-100) tapping üzemmódban használtuk AFM-tűk alkalmazásával (NSC15, MikroMasc), a mérések értékelése XEP1.5 (PSIA, Liestal, Svájc) szoftverrel történt [134].

5.8. Tömegspektrometria

A hisztidinkoncentrációt tömegspektrométerrel mértük API 2000 (Applied Biosystems, CA, USA) [125]. A méréshez a metanolban hígított, izotóppal jelölt l-hisztidint (U-13C6, 98%; U-D5; U-15N3) (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA) a vizsgálandó szérummal együtt szűrtük Millipore Multiscreen Solvinert (MA, USA). A jelöletlen és jelölt hisztidin arányából következtettünk a vizsgálandó minta hisztidinkoncentrációjára.

Az ízületi folyadékból szeparált mikrovesiculák fehérjetartalmának vizsgálata szintén tömegspektrometriával történt. Nanoflow ultrahatékony folyadékkromatográfia alkalmazásával (nanoAcquity, Waters, Milford, MA, USA) választottuk el egymástól és Q-TOF (quadrupole time-of-flight) Premier tömegspektrométerrel (Waters) vizsgáltuk a triptikus peptideket [135]. A SwissProt_51.6 adatbázisban fellelhető fehérjékhez hasonlítottuk a fragmensek méretét. Azonosítottnak abban az esetben tekintettük a peptideket, ha legalább 95 százalékos valószínűséggel megtalálhatóak voltak a mintában a Peptide Prophet algoritmus alapján [136]. A szintetizált peptidek (lásd 5.14. fejezet) karakterizálása szintén tömegspektrometriával (Bruker Daltonics Esquire 3000+ tömegspektrométer, Bremen, Németország) történt [137, 138].

5.9. Western blot

A mintákat PBS-ben (phosphate buffered saline, Sigma) mostuk, majd lizálás történt foszfatáz- és proteázgátlók jelenlétében [121, 124]. A fehérjekoncentrációt Lowry-módszerrel, (Sigma) vagy bicinchoninic acid (BCA) mikrokittel (Thermo Scientific, Pierce,

Rockford, IL, USA), vagy Bradford-módszerrel (Bio-Rad, CA, USA) mértük. A 10-50 µg fehérjét tartalmazó mintát redukáló loading pufferrel (Lane Marker Reducing Sample Buffer, Thermo Scientific, Pierce, Rockford, IL, USA) forraltuk, majd az általunk öntött vagy előre gyártott poliakrilamid gélekben (Lonza, Basel, Svájc) futtatuk. Blottolást követően a megfelelő antitestekkel inkubáltuk a membránokat, néhány esetben SuperSignal Western blot Enhancert (Thermo Scientific, Pierce, Rockford, IL, USA) használtunk. Mosást követően a jelölt fehérjéket *enhanced* chemiluminescence (ECL, ECL Plus reagent, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Egyesült Királyság vagy Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus; PerkinElmer, MA, USA) módszerrel standard röntgenfilmen (Kodak, NY, USA), vagy Kodak Image Station 440CF alkalmazásával tettük láthatóvá. A kiértékeléshez egyes esetekben ImageJ programot (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) vagy Kodak 1D Image Analysis software-t (Kodak) használtunk. Kontrollként aktin-, tubulin-, transzaldoláz- vagy Ponceau-festést alkalmaztunk.

5.10. ELISA és ELISPOT módszerek

5.10.1. ELISA

Az IL-2 szintjét sejtkultúra-felülszóban (BD OptEIA) [124], az ACPA [120, 139, 140], (Euro-diasznosztika, Nijmegen, Hollandia), az RF [120, 139], (Autostatmii, Hycor Biomedical GmbH, Kassel, Németország), a PAD4 [120], az össz-IgG és IgM szérumszintjét [139] a betegek szérummintáiban, a citrullinált peptidek kötődését ACPA-antitestekhez [120, 137, 138], a szénhidrát-specifikus természetes antitestek szérumszintjét [139], az anti-C1 inhibitor, anti-C1q antitestszintet betegek szérumában [141], és a C3-komplement szintjét synovialis folyadékban enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) módszerrel mértük [134, 142].

Szérumok reaktivitását vizsgáltuk arginint és citrullint tartalmazó filaggrin, kollagén és vimentin peptidekkel [120, 137, 138]. A peptidszintézis leírását és a peptidek szerkezetét lásd az **5.14. fejezetben**. A peptideket NeutrAvidinnel (5 µg/mL PBS-ben oldva; Thermo Scientific, Waltham, USA) ELISA microplate-re (Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Németország) kötöttük. A lemezeket marha szérumalbuminnal (Sigma) blokkoltuk, ezt követően a vizsgálandó mintákkal inkubáltuk, majd tormaperoxidázzal konjugált nyúl antihumán poliklonális IgG antitesttel (Dako, Glostrup, Dánia) inkubáltuk a lemezeket. Az ellenanyag-kötődést tetrametil-benzidinnel (Sigma) tettük láthatóvá, az abszorbanciát 450 nm-

es és 620 nm-es hullámhosszon mértük (Labsystems Multiskan MS spektrofotométer, Vantaa, Finnország).

5.10.2. ELISPOT

Egyedi sejtek IFN- γ -, IL-4-, IL-10- és IL-17-termelését enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) módszerrel mértük [125, 133]. A megfelelő antitestekkel kezelt ELISPOT lemezeken (MultiScreen; Millipore, MA, USA) inkubáltuk a sejteket, a spotszámot ELISPOT reader (Cellular Technology LTD, Cleveland, OH, USA) alkalmazásával határoztuk meg. RA-s betegek és kontrollok izolált B-lymphocytáit stimuláltuk IL-2- és R848 TLR-agonistával, és mértük az ellenanyag-termelést biotinilált cirtullint/arginint tartalmazó peptidekkel fedett lemezeken, ELISPOT (Mabtech, Stockholm, Svédország) módszerrel [138].

5.11. Nitrit/nitrát- és ATP-mérés

A vad típusú és HDC-KO egerektől nyert szérumból a nitrát/nitrit meghatározása High-Sensitivity Nitrit Assay Kit-t (Molecular probes) alkalmazásával történt [125]. Az ATP-mérés luciferin-luciferáz (Molecular Probes) módszerrel történt [121].

5.12. PCR, RT PCR, transzfekció

5.12.1. Polimorfizmus-vizsgálatok

A genomiális DNS-t etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) plazmából nyertük, QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN Inc, Chatsworth, CA, USA) alkalmazásával [140, 143]. Az egyesnukleotid-polimorfizmus (single nucleotid polimorfizmus, SNP) genotipizáláshoz TaqMan alléldiszkriminációs módszert alkalmaztunk (Applied Biosystems). A polimeráz-láncreakció (PCR) ABI 7000 készülékkel történt, SDS v2.3 szoftver és ABI PRISM 7000 szoftver alkalmazásával (Applied Biosystems).

5.12.2. RT-PCR

A NOS, az INF- γ , hexozaminidáz A (HexA), hexozaminidáz B (HexB), hexozaminidáz D (HexD) és a CD3- ζ mRNS szintet RT-PCR módszerrel mértük [124, 125, 128, 129]. A sejtekből RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) alkalmazásával vontuk ki az mRNS-t, a minták RNS-tartalmát és -minőségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) határoztuk meg. Mintánként 1 μ g RNS-t írtunk át cDNS-sé, a mérések során 1 mM dezoxiribonukleotidot (dNTP), random hexamer oligonukleotidot, RNasin RN-áz-gátlót és reverz transzkriptázt (valamennyi: Promega, Madison, WI, USA) használtunk 40 μ l végtérfogóban. A cDNS-ből SensiFast Hi-Rox PCR master mix-szel (Bioline Reagents Ltd, London, Egyesült Királyság), a megfelelő primereket alkalmazva, valós idejű PCR-protokoll alapján végeztük a méréseket, ABIPrism 7000 (Foster City, CA, USA) típusú berendezésen. Valamennyi esetben legalább három párhuzamost mértünk, az eredményt a hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HGPRT) mRNS-szintre vonatkoztatva értékeltük.

5.12.3. Transzfekció

Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza, Basel, Svájc) alkalmazásával, a gyártó által előírt protokollnak megfelelően transzfektáltunk Jurkat-sejteket, az Amaxa Nucleofector Device II (Lonza) elektroporátorral X-001 programon. A sejteket kontroll eGFP-vektorral vagy *enhanced* GFP (eGFP)–SLAP cDNS vektorral (mindkettő 10 μ g; GeneCopoeia, Rockville, MD, USA) transzfektáltuk, a transzfekció hatékonyságát áramlási citometriával ellenőriztük. SLAP small interfering RNA (siRNA) transzfekcióval tanulmányoztuk a SLAP szerepét a CD3- ζ lánc szabályozásában [124].

5.13. Enzimhisztokémia és immunhisztokémia

5.13.1. Glikozidázok azonosítása enzimhisztokémiával

A chamber slide-on (Nunc Inc, Naperville, IL, USA) tartott fibroblastokat ImaGene Green C₁₂FDGlcU β -D-glükuronidázzal vagy ELF 97 *N*-acetil-glükózaminid szubsztráttal (Molecular Probes) inkubáltuk, majd a felesleg kimosása után Bio-Rad MRC 1024 konfokális lézer scanning mikroszkóppal (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) értékeltük a méréseket [128].

5.13.2. Immunhisztokémia

5.13.2.1. Glükózaminoglikán- (GAG) ellenes antitestek vizsgálata

A normál porcából kriosztát alkalmazásával készített metszeteket lemezekre (Super Frost, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) vettünk fel. Fixálást követően 5%-os *bovin szérum albuminnal* (BSA, Sigma) blokkoltuk a nem specifikus kötőhelyeket. Ezt követően a hígított vizsgálandó mintákat fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt anti-humán Ig antitesttel (Sigma) inkubáltuk, majd Bio-Rad MRC 1024 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a metszeteket [139].

5.13.2.2. CK7, PAD4 és citrullinált proteinek szöveti kifejeződésének vizsgálata

4 µm vastag TMA (tissue microarray) sorozatmetszeteket készítettünk a tüdődaganatban szenvedő betegek mintáiból [120]. Minden esetben legalább két mintát értékeltünk, és az átlagot használtuk a statisztikai elemzéshez, kontrollként tonsillametszetet és adenocarcinomás beteg nyirokcsomójából készült metszetet alkalmaztunk. A szöveti expressziót NovoLink Polymer kit alkalmazásával (Novocastra/LEICA, Newcastle Upon-Tyne, Egyesült Királyság) jelenítettük meg. A melegítést, blokkolást és Protein Block (Novocastra/LEICA) reagenssel történő inkubációt követően monoklonális egér antihumán-CK7 (1:500-as hígítás; Novocastra/LEICA), antihumán-PAD4 (1:400-as hígítás; Sigma Aldrich) vagy anticitrullin (1:4000-es hígítás; Abnova Corporation, Taipei, Tajvan) antitesttel jelöltük a mintákat. A peroxidázaktivitást diaminobenzidin (DAB) -H₂O₂ oldattal jelenítettük meg, ezt követően hematoxilinnel festettük a metszeteket, és Faramounttal rögzítettük a lemezen (Dako, Glostrup, Dánia). A jelet Panoramic Scan szoftverrel (3DHISTECH, Budapest, Magyarország) digitalizáltuk. Az immunhisztokémiai pontszám számítása: festődési intenzitás (0: negatív festődés, 1: enyhe festődés, 2: közepes festődés, 3: erős festődés) X a pozitív sejtek százalékos aránya (0: 0%, 1: <10%, 2: 10–49%, 3: 50–80%, 4: >80%). Így 4 csoportot különítettünk el: 0 pont: nincs expresszió, 0,5–4,4 pont: gyenge kifejeződés, 4,5–8,4 pont: közepes kifejeződés, 8,5–12 pont: erős kifejeződés.

5.14. Citrullint tartalmazó peptidek szintézise

A peptidek előállítása szilárd fázisú peptidszintézissel történt, Fmoc/^tBu stratégiát alkalmazva. Az N- és C-terminális biotinilálás hatását az ACPA-kötődésre arginint/citrullint

(X = citrullin) tartalmazó filaggrin-epitóp peptideken vizsgáltuk [144]. Az 5-aminosavból álló ($^{311}\text{TRGRS}^{315}/^{311}\text{TXGRS}^{315}$) vagy a 19 aminosavból álló ($^{306}\text{SHQESTRGRSRGRSGRSGS}^{324}/^{306}\text{SHQESTXGXSGRSGRSGS}^{324}$) peptidek N- vagy C-terminálison biotinilált származékainak szintézise Rink Amid-4-metilbenzidrilamin (Rink Amide-MBHA) gyantán történt [120, 137, 138]. A C-terminálison biotinilált filaggrin peptidek $^{311}\text{TXGXS}^{315}$, $^{311}\text{TRGXS}^{315}$, vimentin peptid $^{65}\text{SAVRAXSSVPGVR}^{77}$ és kollagén peptid $^{359}\text{AXGLTGXPGBA}^{369}$ (X=citrullin) szintézise szintén Fmoc/ ^tBu módszerrel történt [138].

A 9-fluorenilmetiloxikarbonil (Fmoc) csoporttal védett aminosavak kapcsolása *N,N'*-diizopropilkarbodiimid/1-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt) kapcsolószerekkel történt *N,N*-dimetilformamidban (DMF), a gyanta kapacitásának megfelelően 3-4-szeres felesleget alkalmazva. Az aminosav-származékokat és gyantákat az IRIS Biotech GmbH (Marktredwitz, Németország) és a Reanal (Budapest, Magyarország) cégektől vásároltuk meg. A kapcsolat végbemenetelét ninhidrin-módszerrel ellenőriztük [145]. A peptid N- vagy C-terminálisára biotinil-6-amino-hexánsavat kapcsoltunk. A C-terminális biotinilálás esetén a peptid szekvenciáját C-terminálison egy Lys-nel hosszabbítottuk meg. A peptidek C-terminálisa minden esetben amidálva volt, míg a szabad N-terminálist acetilezéssel védtük. A peptidek tisztítása fordított fázisú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) (Knauer, Bad Homburg, Németország), karakterizálása analitikai RP-HPLC (Knauer) és tömegspektrometria (Bruker Daltonics Esquire 3000+ tömegspektrométer, Bremen, Németország) módszerekkel történt. Az ACPA-kötődést ELISA-módszerrel vizsgáltuk lásd **5.10.1 fejezet**.

A citrullint tartalmazó és a citrullint nem tartalmazó humán és egér aggregán peptidek szintézise szintén szilárd fázisú peptidszintézissel, Fmoc/ ^tBu -módszerrel, Rink Amide-MBHA gyantán történt [133]. A peptidek tisztítására és karakterizálására RP-HPLC és tömegspektrometria módszereket alkalmaztunk, a szintetizált peptidek szekvenciája megfelelt a humán és egér aggregán 70–84 aminosav-szekvenciájának. Humán peptidek: $^{70}\text{ATEGRVRVNSAYQDK}^{84}$ (hATE-RR), $^{70}\text{ATEGRVCitVNSAYQDK}^{84}$ (hATERX), $^{70}\text{ATEGCitVRVNSAYQDK}^{84}$ (hATE-XR), $^{70}\text{ATEGCitVCitVNSAYQDK}^{84}$ (hATE-XX); egér peptidek: $^{70}\text{ATEGQVRVNSIYQDK}^{84}$ (mATE-R), $^{70}\text{ATEGQVCitVNSIYQDK}^{84}$ (mATE-X).

5.15. Extracelluláris vesiculák izolálása, differenciál detergens lízis

5.15.1. EV-k izolálása

Az EV-k vizsgálatára hígított natív mintákat (plazma, ízületi folyadék) vagy izolált vesiculákat használtunk. Az izolálás során a vizsgálandó mintát 800 nm-es szűrőn átszűrtük, ezt követően 20500 g-n 60 percig centrifugáltuk. Az üledéket PBS-ben (phosphate buffered saline) vettük fel, majd a mintákat ismételtén centrifugáltuk 20500 g-n 40 percig. Mosást követően az üledéket PBS-ben vagy desztillált vízben vettük fel. A minták fehérje tartalmát microBCA-módszer alkalmazásával határoztuk meg [134, 135].

5.15.2. Differenciál detergens lízis

A vesiculák detergensérzékenységét áramlási citometriával (lásd az **5.5 fejezetet** is) vizsgáltuk, feltételezve, hogy az EV-k az immunkomplexeknél érzékenyebbek a detergensre. Vizsgáltuk, hogy az immunkomplexek (IgM – anti-IgM-FITC) és a vesiculák áramlási citometriás jelét hogyan befolyásolja a detergens (Triton X-100, Sigma). A detergens lízis után is látható jeleket nem tekintettük vesicularis eredetűeknek [134, 135].

5.16. Dinamikus fényszórásmérés (DLS) és Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

5.16.1. DLS

A DLS a szuszpenzióban lévő partikulák fényszórásának mérésére alkalmas módszer, mely az EV-k méreteloszlására utal, a méreteloszlást a maximum entrópia módszer alkalmazásával határoztuk meg. A nagyobb méretű részecskék nagyobb fényszórásuk miatt jelentősebben hozzájárulnak a fényszórási képhez, ennek ismeretében értékelhető a többféle méretű részecskét tartalmazó rendszerek DLS-képe [134].

5.16.2. NTA

A DLS-hez hasonlóan az NTA módszer is az EV-k méreteloszlásának jellemzésére használható, fényszóráson alapuló módszer. Az NTA-vizsgálatok során NanoSight LM10 módszert alkalmaztunk [146] (NanoSight Ltd., Wiltshire, Egyesült Királyság) [135].

5.17. Turbidimetria

A CRP-szintet turbidimetriás módszerrel [139] (Randox laboratories Ltd, Crumlin, County Antim, Egyesült Királyság), Olympus AU 600 készülékkel (Olympus Medical Systems, Europa GmbH, Hamburg, Németország) mértük.

5.18. Statisztikai módszerek

A statisztikai értékeléshez SPSS 15.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) és SigmaStat 11.0 (Systat Software, Il, Chicago, USA), STATISTICA 7.1 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA) programokat használtunk. A csoportok közötti különbségeket t-próbával, Mann–Whitney-teszttel, Kruskal–Wallis-varianciaanalízissel és Fischer-teszttel elemeztük. A normalitás vizsgálata Kolmogorov–Smirnov-teszt alkalmazásával történt. A korreláció vizsgálata Spearman-, Pearson-módszerrel vagy lineáris regressziószámolással történt. Több csoport összehasonlítása ANOVA-módszerrel történt, post hoc tesztként Tukey- vagy Mann–Whitney-tesztet alkalmaztunk Bonferroni-korrekcióval, a 0,05 alatti p-értéket tekintettük szignifikánsnak. Az SNP-vizsgálatok statisztikai értékelése során a Cochran–Armitage-módszert alkalmaztuk, a Hardy–Weinberg-equilibrium (HWE) értékelő programot használtuk (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Az asszociációt esélyhányadossal (odds ratio, OR), adtuk meg, 95%-os konfidenciaintervallumok (CI) mellett.

6. Eredmények és megbeszélés

Ebben a részben a célkitűzéseknek megfelelően röviden bemutatásra kerülnek a kísérletes munka eredményei. Az értekezésben a terjedelmi korlátok miatt nem részletezett kísérleti eredmények az egyes közleményekben megtalálhatóak.

6.1. Természetes autoantitestek vizsgálata RA-ban

6.1.1. GAG-antitestek RA-ban

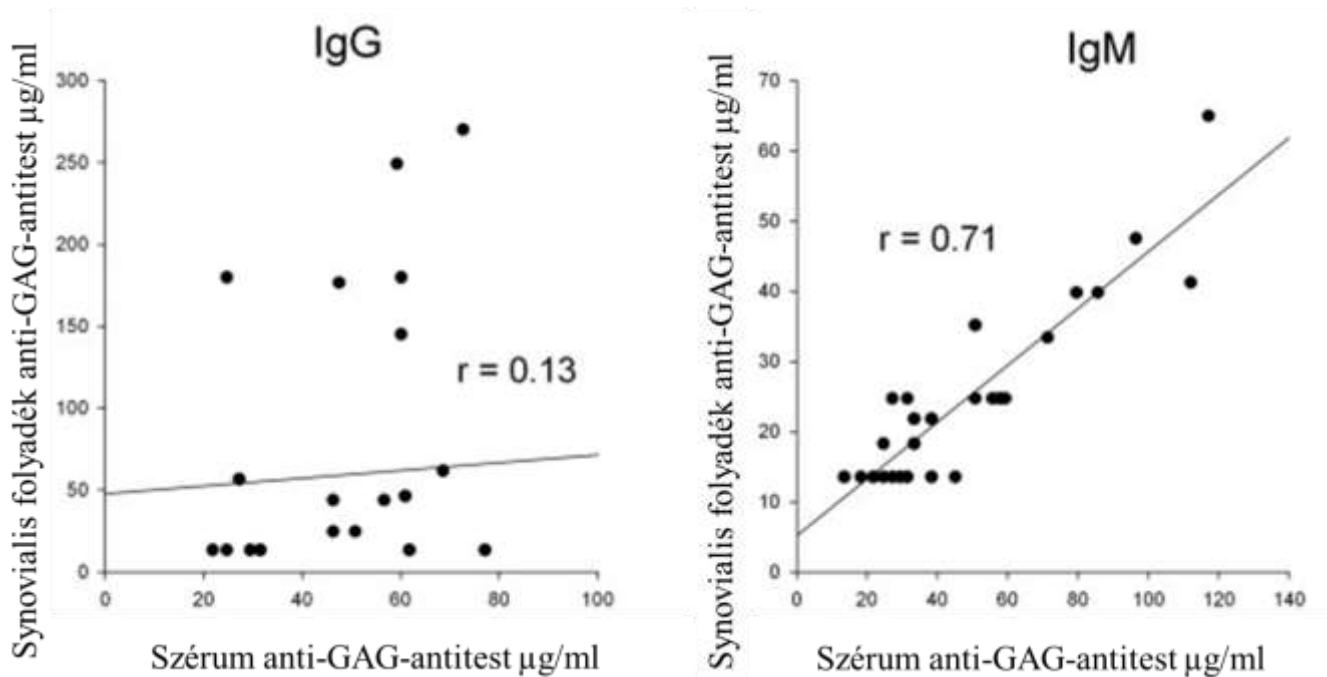
A szérum-IgM jelentős részben a CD5+ B1 B-lymphocyták által termelt, a természetes autoimmunitáshoz tartozó polireaktív, kis affinitású antitest (**lásd a 3.1. fejezetben is**). A természetes autoantitesteknek szerepük van a saját antigének iránti tolerancia fenntartásában. A tolerancia sérülése szerepet játszhat az autoimmun betegségek patomechanizmusában is, ezért vizsgáltuk a GAG ellen termelődő természetes autoantitesteket RA-ban [139].

Az anti-GAG antitestszint igen alacsony volt a köldökzsinórvérben (**1. táblázat**). RA-s betegek szérummintáiban az egészséges kontrollokénál 2-4-szer nagyobb antitestszinteket mértünk ($p<0,001$). Az anti-GAG antitestek szintje nagyobb volt a szérumban, mint a synovialis folyadékban ($p<0,001$).

Antitest (µg/mL)	Ködkzsinórvér	Kontroll szérum	RA szérum
	átlag ± SEM	átlag ± SEM	átlag ± SEM
Anti-kondroitin-szulfát A IgM	1,63 ± 0,3	750,95 ± 343,1	1225,27 ± 354,2
Anti-kondroitin-szulfát B IgM	1,36 ± 0,2	608,00 ± 302,3	1300,61 ± 389,2
Anti-kondroitin-szulfát C IgM	1,73 ± 0,4	673,70 ± 305,7	1964,34 ± 461,7
Anti-keratán-szulfát IgM	1,63 ± 0,2	275,11 ± 184,5	836,87 ± 321,3
Anti-heparán-szulfát IgM	2,27 ± 0,4	1115,91 ± 383,0	2605,36 ± 516,8
Anti-hyaluronsav IgM	1,27 ± 0,2	4,32 ± 0,9	14,18 ± 4,5
Anti-kondroitin-szulfát A IgG	1,54 ± 0,4	203,09 ± 89,1	872,79 ± 310,7
Anti-kondroitin-szulfát B IgG	1,77 ± 0,8	508,07 ± 215,9	1551,62 ± 417,2
Anti-kondroitin-szulfát C IgG	1,27 ± 0,1	241,53 ± 176,3	717,86 ± 273,3
Anti-keratán-szulfát IgG	4,91 ± 4,3	1871,63 ± 481,1	2704,11 ± 525,2
Anti-heparán-szulfát IgG	4,05 ± 3,8	1066,59 ± 326,7	2689,71 ± 515,8
Anti-hyaluronsav IgG	1,09 ± 0,2	960,93 ± 365,3	1227,82 ± 379,3

1. táblázat. IgM és IgG anti-GAG antitestek koncentrációja (µg/ml) ködkzsinórvérben, egészséges kontrollok és RA-s betegek szérumában [139].

A szérum és a synovialis folyadék anti-GAG IgG-szintje nem korrelált ($r=0,13$) egymással, míg az IgM-szintek között szoros korrelációt találtunk ($r=0,71$, **5. ábra**). Az anti-kondroitin-szulfát C IgM antitestszint korrelált az IgG és IgM RF szintjével ($r=0,384$ és $r=0,388$) ugyanakkor nem korrelált az ACPA-szinttel ($r=0,08$). Immunhisztokémiai módszerrel mérve (lásd **5.13.2.1. fejezet**) a kondroitin-szulfát dózisfüggő módon gátolta az anti-GAG antitestek hialinporchoz történő kötődését.



5. ábra: A szérum és synovialis folyadék anti-GAG-szintjeinek korrelációja [139].

6.1.2. Megbeszélés

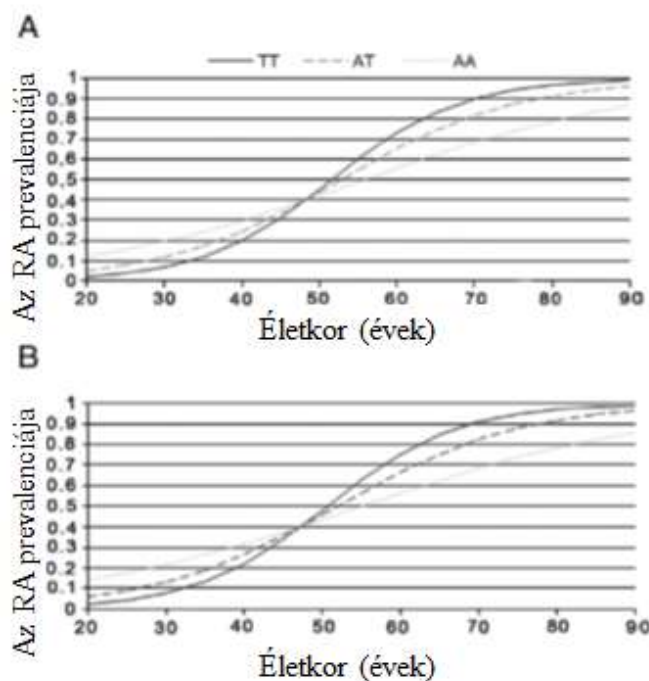
Számos vírus- és baktériumantigén jelentős hasonlóságot mutat a saját antigénekhez. A természetes autoantitestek jellemzően szénhidrátok ellen termelődnek, az immunológiai homunculus részét [147] képezik. A természetes autoantitestek védelmet nyújtanak fertőzések során a saját struktúrákkal is reagáló (potenciálisan autoimmun betegséghez vezető) agresszív immunválasz ellen.

GAG-ok jelentős mennyiségben ürülnek a porcszövetből ízületi gyulladás során, feltehetően ez a magyarázata az RAs betegek szérumában megfigyelhető magas GAG-antitest-szintnek. A GAG-antitestek kötődve a porchoz gátolhatják a saját struktúrák elleni agresszív immunválasz kialakulását, így védő szerepük lehet RA-ban.

6.2. Genetikai polimorfizmusok tanulmányozása

6.2.1. Galektin-8-polimorfizmus

A HLA-DRB1 és a PTPN22 mellett számos más genetikai faktor is hozzájárulhat az RA kialakulásához [4, 16, 17, 18] (lásd a 3.2.1. fejezetben is). Nagyszámú tanulmány vizsgálja az immunmoduláns citokinek, kemokinek szerepét a betegség genetikai hátterének kialakításában. A galektinek immunmoduláns hatása jól ismert, a galektin-8 apoptózisindukáló és gyulladásfokozó hatással rendelkezik, szerepet játszhat több autoimmun betegség patomechanizmusában is [148]. A galektin-8 RA-s synovialis folyadékban a CD44-hez kötődve befolyásolja a lymphocyták apoptózisát [149]. SLE-ben és RA-ban is igazolták galektin-8 elleni antitestek jelenétét [150]. Vizsgáltuk a galektin-8 genetikai változékonyságának szerepét RA-ban. Az ismert galektin-8-polimorfizmusokat a www.ncbi.nlm.nih.gov és a www.Hapmap.org honlapokon elérhető adatbázisok alapján azonosítottuk. Az aminosavcseréhez vezető polimorfizmusok közül az rs2737713 A>T SNP-t választottuk, mely befolyásolhatja a galektin-8 ligandkötődését. Fehér bőrű populációban az A a gyakori, a T a ritka allél. A T-allél polimorfizmusa a fenilalanin/tirozin cseréhez vezető galektin-8 F19Y SNP, melynek gyakoriságát vizsgáltuk [140] RA-ban. Eredményeink szerint a TT genotípus az 50 évesnél idősebb populációban RA-ra hajlamosít, **6. ábra**. A genotípusok eloszlása az ACPA-pozitív betegek körében és a teljes RA-s betegpopulációban nem különbözött szignifikánsan.



6. ábra. Az RA prevalenciája az életkor függvényében a teljes betegpopulációban (A) és a női RA-s betegek (B) körében. A TT genotípus az idősebb korban induló RA-ra hajlamosít [140].

6.2.2. HCgp-39-polimorfizmus

A chitinase 3 like 1 (GHI3L1), más néven human cartilage glycoprotein 39 (HC gp-39) synovialis fibroblastokban termelődik és szerepe lehet az RA patogenezisében [151]. RA-s betegek plazmájában a HC gp-39 szint magasabb, mint az egészséges kontrollokéban [152]. A HC-GP 39 gén funkcionális promoter régiójának polimorfizmusait (rs4950928; rs10399931) vizsgáltuk RA-ban [143]. A vizsgált polimorfizmusokban nem találtuk különbséget az allélok és a genotípusok gyakoriságában az RA-s betegek és az egészséges kontrollok között.

6.2.3. Megbeszélés

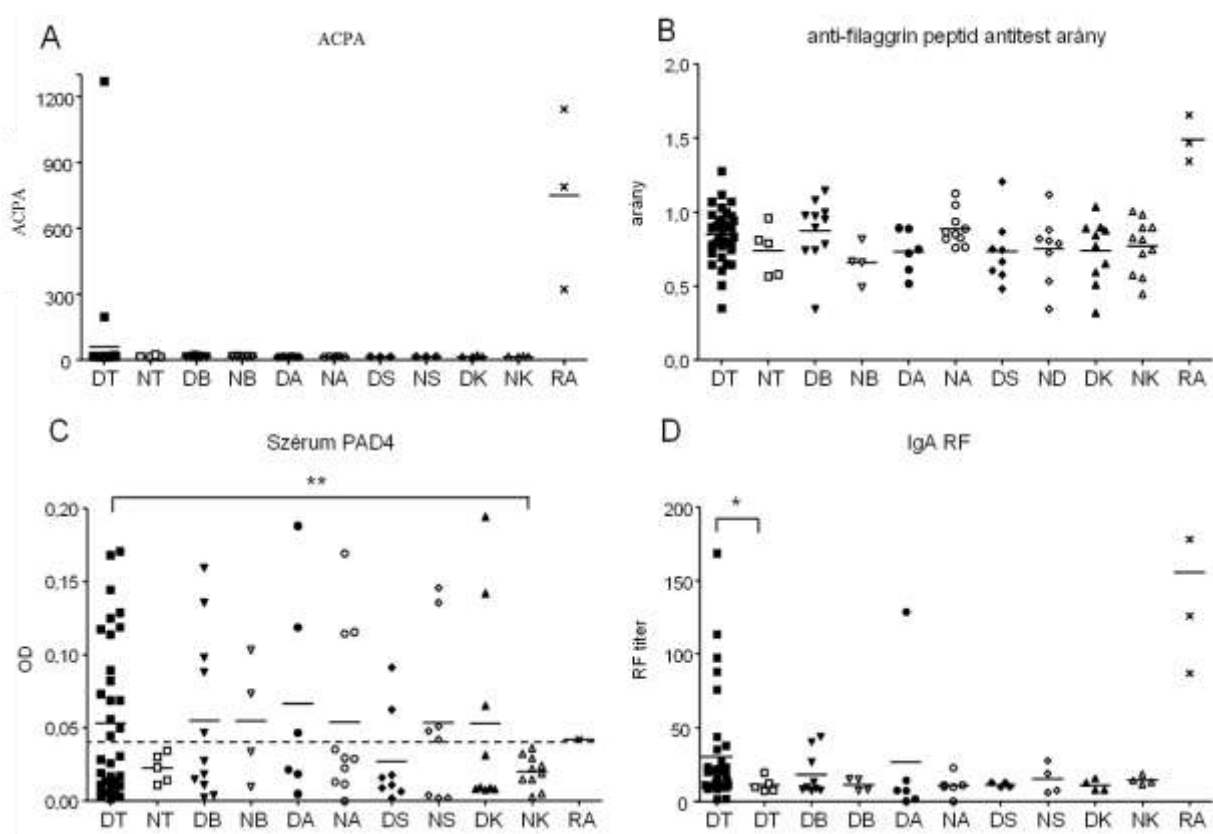
Az SNP- és teljesgenom-vizsgálatok számos gén asszociációját igazolták RA-val [4, 16, 17]. Munkacsoportunk a galektin 8 és a HC-gp-39 polimorfizmusait vizsgálta. A galektin 8 TT polimorfizmus RA-ra hajlamosító hatása az életkorral változik, a fiatalabb populációban védő, míg idősebb korban hajlamosító szerepe van (antagonisztikus pleiotropia). Mindezek alapján az idősebb korban induló RA genetikája eltérő lehet a fiatal korban induló betegségtől. A HC-gp-39-polimorfizmus nem asszociál RA-val, így a korábban leírt fokozott HC-gp-39-termelődés [152] feltehetően nem az oka, hanem inkább a következménye a betegségnek.

6.3. A citrullináció szerepének vizsgálata a tolerancia elvesztésében; citrullinált proteinek elleni antitestek specifitásának és antigénkötésének vizsgálata

6.3.1. Citrullináció immunogenitásának vizsgálata tüdőrákban

Tüdőrákban fokozott a daganatos szövet citrullinációja, gyakori a paraneopláziás szindróma, mely jelentkezhet polyarthrit formájában. A dohányzás központi szerepe jól ismert mind az RA [16, 17, 153, 154] mind a tüdőrák kóroktanában [155], és a dohányzás fokozza a citrullinációt a tüdőben. Mindezek miatt vizsgáltuk tüdőrákban a daganatos szövet citrullinációját és az ACPA és RF antitestek termelődését [120]. A légzőszervi betegség és dohányzási szokás alapján 10 vizsgálati csoportot különböztettünk meg: egészséges kontroll, asthma bronchialeban, sarcoidosisban, krónikus obstruktív tüdőbetegségben, tüdőrákban szenvedő dohányos és nem dohányos egyéneket tartalmaztak a csoportok. Polyarthrit és szisztémás autoimmun betegség nem fordult elő a vizsgált betegek körében.

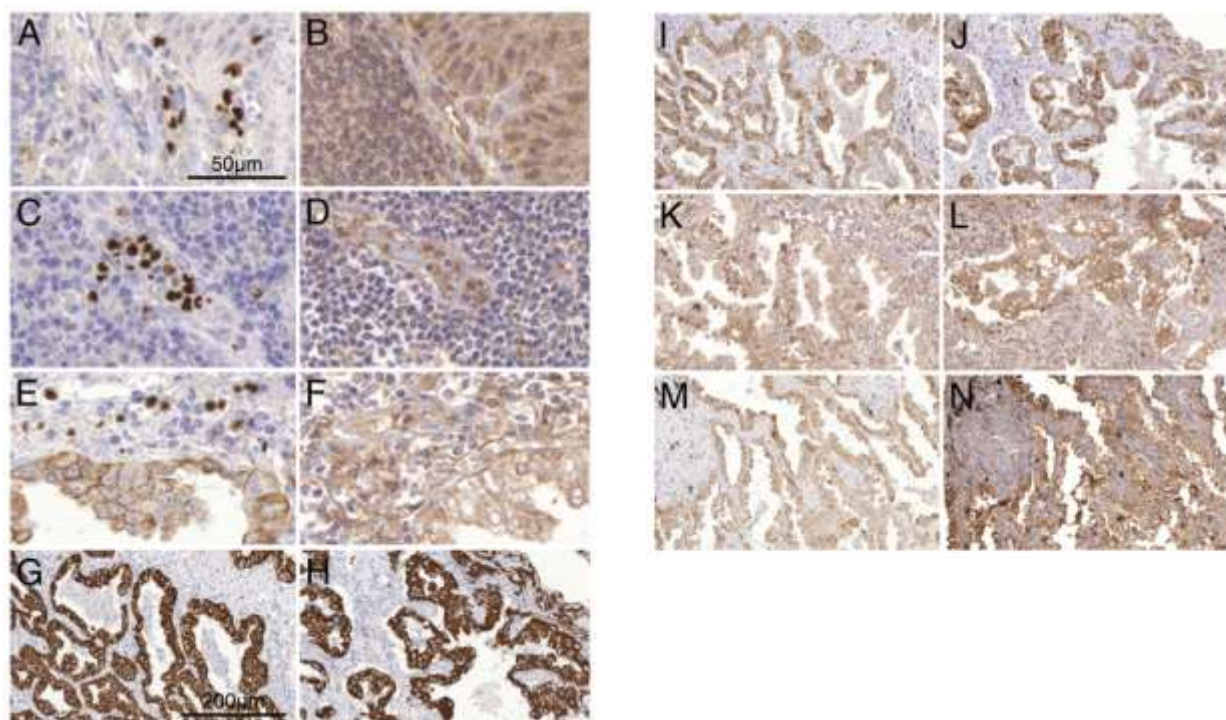
Mindössze két dohányos, tüdőrákban szenvedő betegnél mértünk magas ACPA-szintet (**7.A. ábra**) [120]. A citrullinált és a nem citrullinált filaggrin peptideket felismerő antitestek aránya 1 körül volt minden betegcsoportban (**7.B. ábra**). Az egészséges nem dohányos csoportban mért átlag + kétszeres szórást meghaladó PAD4-szint nem fordult elő a nem dohányos tüdőrákos betegek körében, míg a dohányos tüdőrákos betegek 46 százalékában ezt a szintet meghaladó értéket mértünk. Eredményeink szerint a dohányos tüdőrákos betegek szérumában a PAD4 szintje szignifikánsan magasabb a nem dohányos egészséges kontrollokénál ($p=0,007$, **7.C. ábra**). A dohányos tüdőrákos betegekben magasabb volt az IgA RF-szintje mint a nem dohányos tüdőrákos betegekben (**7.D. ábra** $p=0,049$). Az RA-s betegekből származó minták kontrollként szolgáltak.



7. ábra. ACPA-, anti-filaggrin, IgA RF-antitest- és PAD4-szint a vizsgált betegcsoportokban. **A:** ACPA-szintek a vizsgált betegcsoportokban; **B:** a citrullinált/ arginint tartalmazó filaggrin peptideket felismerő antitestek aránya; **C:** a PAD4 enzim szérumszintje; **D:** az IgA RF-szint a vizsgált betegcsoportokban. Rövidítések: D dohányos, N nem dohányos,

K kontroll, A: asthma bronchiale, S: sarcoidosis, B: krónikus obstruktív tüdőbetegség, T: tüdőrák [120].

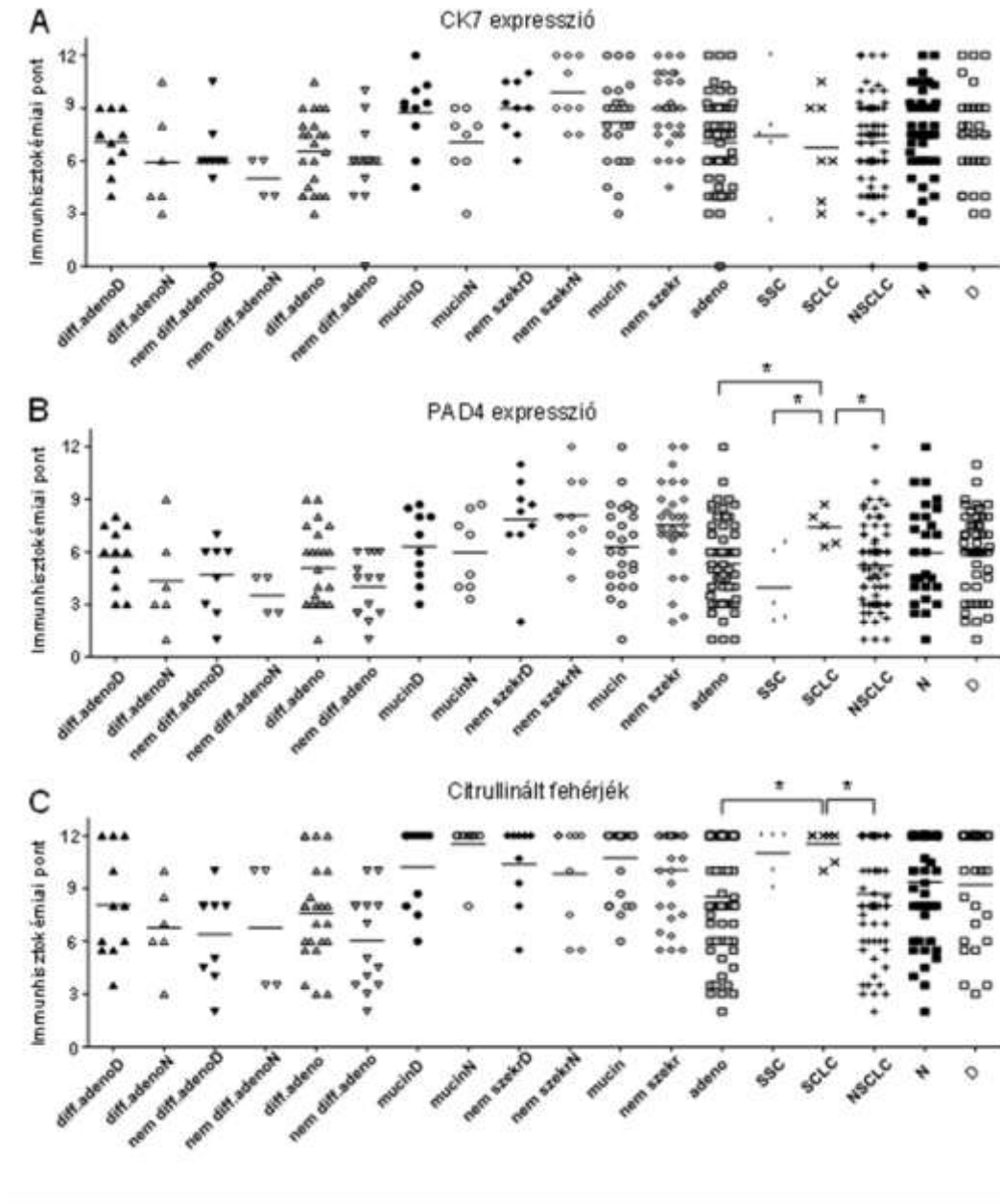
Vizsgáltuk a citrullinált fehérjék, a cytokeratin-7 (CK7) és a PAD4 kifejeződését immunhisztokémiával (**8. ábra**). A granulocyták sejtmagja, a tumoros sejtek citoplazmája és a tumor környezetében lévő monocyták, makrofágok magja intenzív PAD4-festődést mutatott. A tumoros sejtekben a citoplazma, míg a környező makrofágokban a sejtmag citrullinációja ábrázolódott. A CK7-festés a tumoros szövet elkülönítésére szolgált. A PAD4 és a CK7-festés igen jól korrelált egymással ($p < 0,0001$), ugyanakkor a citrullinált proteinek kifejeződése nem volt specifikus a tumoros szövetre, a tumor körüli szövetekben is festődtek citrullinált fehérjék.



8. ábra. *A citrullinált fehérjék, a CK7 és a PAD4 immunhisztokémiai vizsgálata. A: tonsilla PAD4-festése, negatív kontroll, a granulocyták magja környékén festődés látható; B: a tonsilla következő metszete, citrullináltfehérje-festés, kifejezett citrullináció ábrázolódott; C: tumoros betegből származó nyirokcsomó PAD4-jelölése, a granulocytá*

sejtmagok intenzív festődése figyelhető meg; D: a nyirokcsomó következő metszete, citrullinált fehérjék jelölése; E: PAD4 kifejeződése adenocarcinómában, citoplazmatikus festődés figyelhető meg a tumoros sejtekben, míg a mag festődött a tumort körülvevő monocytákban, makrofágokban; F: az adenocarcinoma következő metszete, a tumoros sejtekben citoplazmatikus citrullináció figyelhető meg, míg a környező macrophagokban magfestés látható; G: nem dohányzó adenocarcinomás betegből származó minta CK7-festése, a CK7 elkülöníti a tumoros és a nem tumoros szövetet; a G, I és K metszetek egy mintából származnak; H: dohányzó adenocarcinomás betegből származó minta CK7-festése, a CK7 az előző metszethez hasonlóan jól elkülöníti a tumoros és a nem tumoros szövetet; H, J és L metszetek egy mintából származnak; I: nem dohányzó adenocarcinomás beteg mintájából készített következő metszet, a PAD4-jelölés kolokalizálódik a CK7-festéssel és jól elkülöníti a tumoros szövetet; J: dohányzó adenocarcinomás beteg mintájából készített következő metszet, a PAD4-jelölés kolokalizálódik a CK7-festéssel és elkülöníti a tumoros szövetet; K: nem dohányzó adenocarcinomás beteg mintájából készített következő metszet, citrullináltprotein-jelölés, a citrullináció nem specifikus a tumorszövetre, a környező nem tumoros szövet is festődést mutat; L: a dohányos adenocarcinomás beteg mintájából készített következő metszet, citrullináltprotein-jelölés, a citrullináció nem specifikus a tumorszövetre; M: PAD4 kifejeződése laphámrákban, az adenocarcinomához hasonló festődés látható; N: citrullináció laphámrákban, az adenocarcinomához hasonló festődés látható; nagyítás A-F:40X; G-N:10X [120].

A CK7, PAD4 és citrullinált fehérjékre vonatkozó immunhisztokémiai pontszámok értékeit a **9. ábra** tartalmazza. Magasabb volt a kissejtes tüdőrákban a nem kissejtes tüdőrákhoz ($p=0,0232$), az adenocarcinomához ($p=0,0291$) és a laphámrákhoz ($p=0,0159$) képest a PAD4-kifejeződés mértéke. Magasabb volt továbbá a citrullinált fehérjék expressziója kissejtes tüdőrákban a nem kissejtes tüdőrákhoz ($p=0,0230$) és az adenocarcinomához ($p=0,0175$) képest. A CK7 és a citrullináció immunhisztokémiai pontszámai (score) korreláltak egymással ($p<0,0021$), ugyanakkor a PAD4 és a citrullináció pontszámai nem mutattak korrelációt. A dohányos és a nem dohányos betegek között nem találtunk különbséget a CK7, PAD4 és a citrullinált fehérjék kifejeződésében.

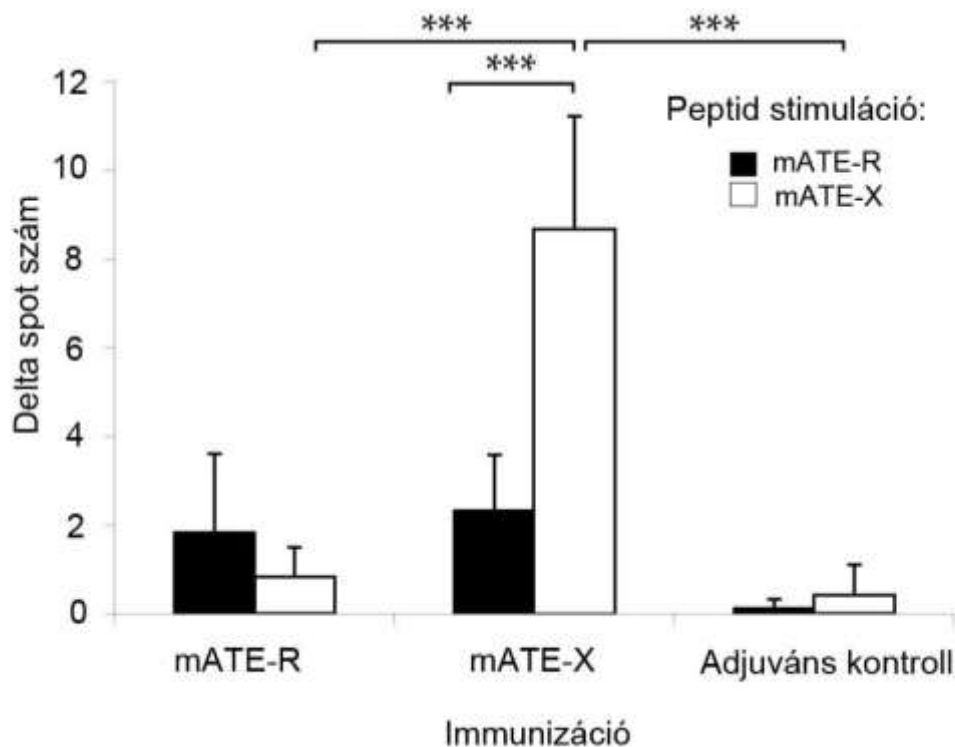


9. ábra. CK7, PAD4 és citrullinált fehérjék immunhisztokémiai pontszáma. Rövidítések: diff.adeno: differenciált adenocarcinoma; nem diff.adeno: nem differenciált adenocarcinoma; SCLC: kissejtes tüdőrák; NSCLC: nem kissejtes tüdőrák; mucin: mucintermelő daganat; nem szekr: nem szekretáló tumor; SSC: laphámrák; D: dohányos; N: nem dohányos [120].

6.3.2. Immundomináns T-lymphocyta-epitop citrullinációjának vizsgálata kísérletes arthritisben

Aggregán immundomináns epitop peptidek alkalmazásával vizsgáltuk a citrullináció szerepét a tolerancia áttörésében [133]. Citrullinált és nem citrullinált egér aggregán peptidekkel [lásd 5.14. fejezet] történt immunizációt követően nyirokcsomósejteket izoláltunk és mértük az IFN- γ termelést az aggregán peptidekkel történt *in vitro* restimulációt követően (10. ábra). Alacsonynak adódott az IFN- γ -termelő sejtek száma ELISPOT-módszerrel mérve, ugyanakkor a mATE-X immunizált egerekből izolált sejtek, mATE-X peptiddel történő restimulációt követően szignifikánsan több IFN- γ -t termeltek, mint a vad típusú (mATE-R) peptiddel történt immunizáció esetén.

Vizsgáltuk egér és humán aggregán peptidek kötődését MHC II molekulához [133]. Eredményeink szerint a hATEXX peptid, melyben mindét arginint citrullinra cseréltük, kötődik a legerősebben az MHC II-molekulához. PG-TCR TG egér (lásd 5.4.2 fejezet) lépsejtjeit hatékonyan stimulálják a hATE-RR, hATE-XR és hATE-XX peptidek, az egéreredetű peptidek (mATE-X és mATE-R) nem indukáltak T-sejt-proliferációt [133].



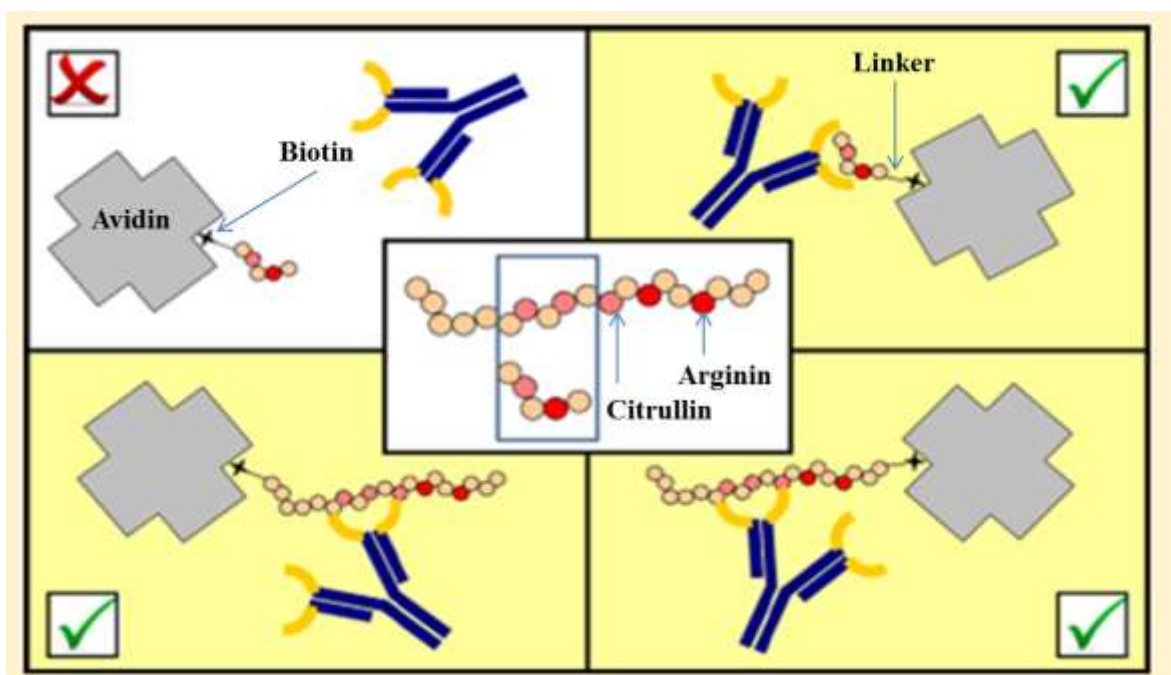
10. ábra. Saját peptiddel immunizált egerek nyirokcsomósejtjeinek IFN- γ -termelése. ELISPOT-rendszerben mértük BALB/c egerek saját peptiddel történt immunizációját követő 9. napon a nyirokcsomósejtek IFN- γ -termelését. Egér ATE-peptiddel (mATE-R/mATE-X vagy adjuvánssal) immunizált egerekből szeparált sejteket 15 μ g/ml mATE-R vagy mATE-X peptiddel restimuláltunk in vitro. Az y-tengelyen jelölt értékek a stimulált és nem stimulált IFN- γ -termelő sejtek számának különbségét mutatják, az x-tengelyen az immunizáló peptidek illetve peptidkombinációk vannak feltüntetve. ***: $p < 0,001$ (egyutas ANOVA, Tukey post hoc teszt) [133].

6.3.3. Citrullint tartalmazó filaggrin peptidek antigenitásának vizsgálata

6.3.3.1. Az N- és C-terminális biotinizáció szerepének vizsgálata az antigenításban

Az N- és C-terminális biotinizáció hatását az ACPA kötődésére citrullint tartalmazó filaggrin epitop peptideken vizsgáltuk. 5 aminosavból álló (311 TRGRS 315 / 311 TXGRS 315) vagy 19 aminosavból álló (306 SHQESTRGRSRGRSGRS 324 / 306 SHQESTXGXSGRSGRSGS 324) filaggrin peptidek N- vagy C-terminálison biotinizált származékainak antitest-kötődését indirekt ELISA módszerrel mértük (**11. ábra**) [137]. Az avidin-biotin kötés az egyik legerősebb nem kovalens interakció, a biotinizálás lehetővé teszi peptidek stabil kötődését

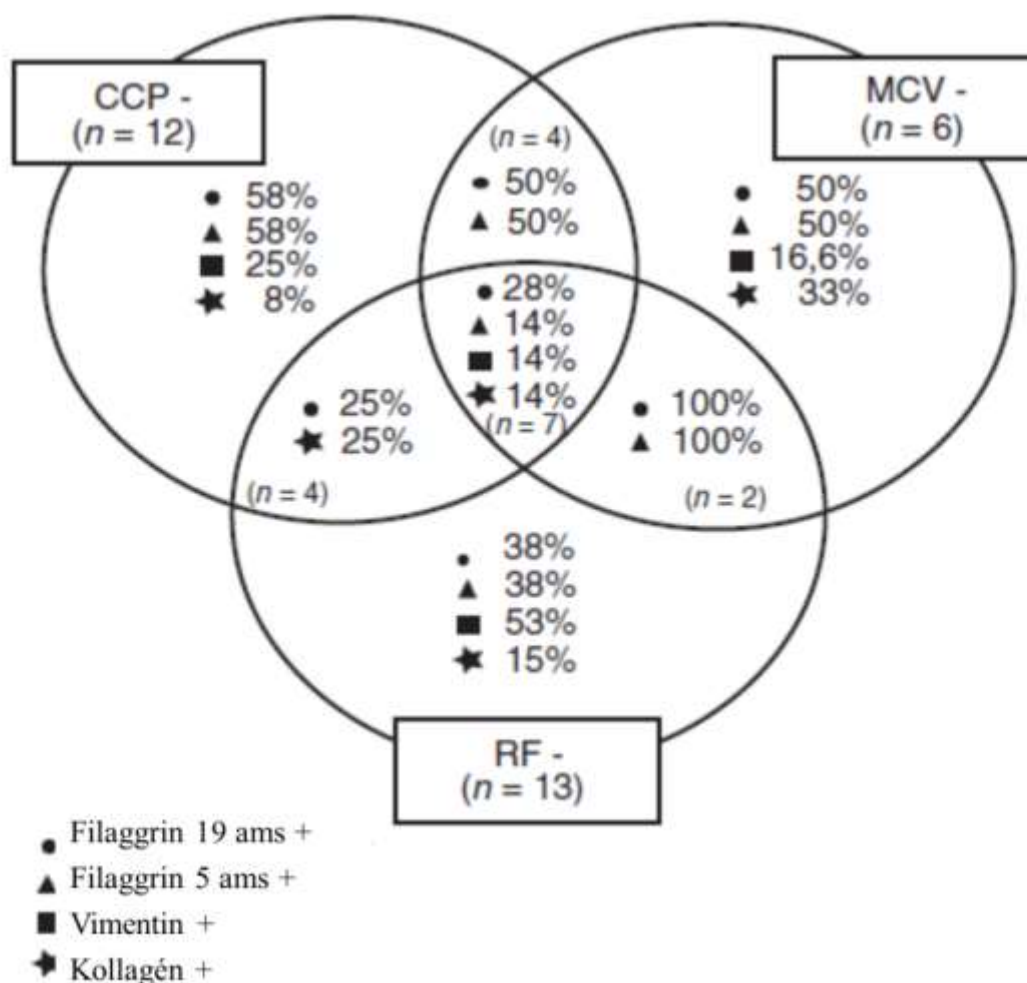
avidinnal fedett ELISA lemezhez. Általában az N terminális peptideket biotinilálják, kevés irodalmi adat áll rendelkezésre arról, hogy az N- és C-terminális biotiniláció hogyan befolyásolja a peptidek antigenitását. Eredményeink szerint a 19 aminosavból álló peptid esetében az N- vagy C-terminális biotiniláció nem befolyásolja érdemben az antitest kötődését, feltehetően azért, mert az antitest által felismert szekvencia (TXGRS) a peptid közepén, az N- és a C-terminálistól megközelítően egyenlő távolságra helyezkedik el. Az 5 aminosavból álló peptid N-terminális biotinilációja ugyanakkor meggátolta az antitest-kötődést, míg a C-terminális biotiniláció nem akadályozza az antitest kötődését. Eredményeink arra utalnak, hogy a 19 aminosavból álló peptid esetén az elsődleges szerkezet, míg az 5 aminosavból álló peptid esetén az elsődleges és a másodlagos szerkezet is alapvetően befolyásolja az antitest kötődését.



11. ábra. 5 aminosavból álló vagy 19 aminosavból álló filaggrin peptidek N- vagy C-terminálison biotinilált származékainak antitest-kötődése. Az 5 aminosavból álló peptid N-terminális biotinilációja gátolja az antitest-kötődést, míg a C-terminális biotiniláció esetén az antitest kötődése zavartalan. 19 aminosavból álló peptid N- vagy C-terminális biotiniláció nem befolyásolja az antitest kötődését [137].

6.3.3.2. Filaggrin, vimentin és kollagén peptidek antigenitásának vizsgálata

Vizsgáltuk RA-s betegek autoantitestjeinek a kötődését citrullinált filaggrin, vimentin és kollagén peptidekhez [138]. Az általunk szintetizált peptidek kötődését a betegek antitestjeihez, továbbá az ACPA-, anti-MCV- és RF-szinteket ELISA módszerrel mértük. A peptidekkel reagáló betegminták többsége magas koncentrációban tartalmazott ACPA- és anti-MCV-antitesteket [138]. A felismert peptidepitopok száma és a CRP, vagy a betegség klinikai aktivitásának mérésére használt disease activity score (DAS) 28 érték között nem találtunk összefüggést. Az általunk vizsgált betegminták 11,78 százaléka (31 minta) ACPA- vagy anti-MCV- vagy RF-negatív volt. A 6 anti-MCV-negatív betegből 5, a 12 ACPA-negatív betegből 9 és a 13 RF-negatív betegből 9 mintái pozitív eredményt adtak az általunk szintetizált antitestekkel (12. ábra). 7 beteg mintája mindhárom módszerrel negatívnak bizonyult, ezekből 3 beteg mintája adott pozitív reakciót legalább egy, általunk szintetizált peptiddel. 18 ACPA-negatív SLE-s beteg mintáinak reaktivitását is vizsgáltuk a filaggrin, vimentin és kollagén peptidekkel, minden SLE-s betegtől származó minta negatív eredményt adott.



12. ábra. Citrullinált peptidekkel reagáló szérumok. Citrullinált, 19 és 5 aminosavból álló filaggrin, vimentin és kollagén peptidekkel reagáló, RA-s betegekből származó szérumok. 7 beteg volt ACPA-, anti-MCV- és RF-negatív, közülük 2 beteg reagált a 19 aminosavból álló filaggrin peptiddel, és 1-1 beteg az általunk szintetizált másik három peptiddel [138].

6.3.4. Megbeszélés

A citrullinált proteinek ellen termelődő antitestek az RA-s betegek jelentős részében megtalálhatóak, diagnosztikus szerepükön túl a betegség patogenézisében is szerepük lehet. Az osteoclastok aktivációját és differenciálódását fokozzák [156], így hozzájárulhatnak az erosiók kialakulásához. Az ACPA az RA kóroktanában betöltött szerepének vizsgálata ma a reumatológiában a kísérletes és klinikai kutatások egyik legérdekesebb és leggyorsabban

fejlődő területe. Munkánk során vizsgáltuk a citrullináció szerepét a tolerancia áttörésében tüdőrákban szenvedő betegeken és állatkísérletek alkalmazásával. Vizsgáltuk továbbá a peptidbiotiniláció hatását a citrullinált proteinek antitestkötésében és tanulmányoztuk új, általunk szintetizált citrullint tartalmazó peptidek ACPA-kötését.

Eredményeink szerint a PAD4- és a CK7-festődés igen jól korrelált, így a PAD4-festés alkalmas lehet a tumoros szövetek elkülönítésére. Érdekes módon, immunhisztokémiai módszerrel vizsgálva, a citrullináció mértéke nem tért el érdemlegesen a dohányos és a nem dohányos betegek mintáiban. Citrullinált fehérjék jelentős mennyiségben voltak jelen a tumoros szövetekben és azok környezetében is. A citrullinált peptidek jelenléte önmagában nem elegendő a tolerancia áttöréséhez és a citrullinált proteinek elleni antitestek termelődéséhez, hiszen a tüdőrákos betegeken jelentős mennyiségben mutattunk ki citrullinált proteineket, de magas ACPA-szintet csak 2 beteg mintáiban mértünk [120]. Befolyásolhatja ugyanakkor az ACPA-antitestek termelődését a genetikai háttér (nem vizsgáltuk ebben a munkában), a tüdőrákban alkalmazott gyógyszeres kezelés és a citrullinált peptidek megjelenésének ideje és a kísérleteink céljából történt mintavétel között eltelt idő. Állatkísérletekben is vizsgáltuk a citrullináció szerepét a tolerancia áttörésében. Az aggregán immundomináns epitop peptidek vizsgálata során a citrullinált peptidekkel történő immunizálás majd *in vitro* restimuláció nagyobb mértékű T-lymhocyt-aktivációt okozott, mint a nem citrullinált peptidek esetében, BALB/c egérben [133]. Ez a megfigyelésünk arra utal, hogy a citrullinációnak ebben a modellben alapvető szerepe van a tolerancia áttörésében. A humán és az állatkísérletes adataink alapján feltételezhető, hogy a citrullináció hozzájárulhat a tolerancia áttöréséhez, de önmagában nem feltétlenül vezet ACPA-termelődéséhez és autoimmun betegséghez.

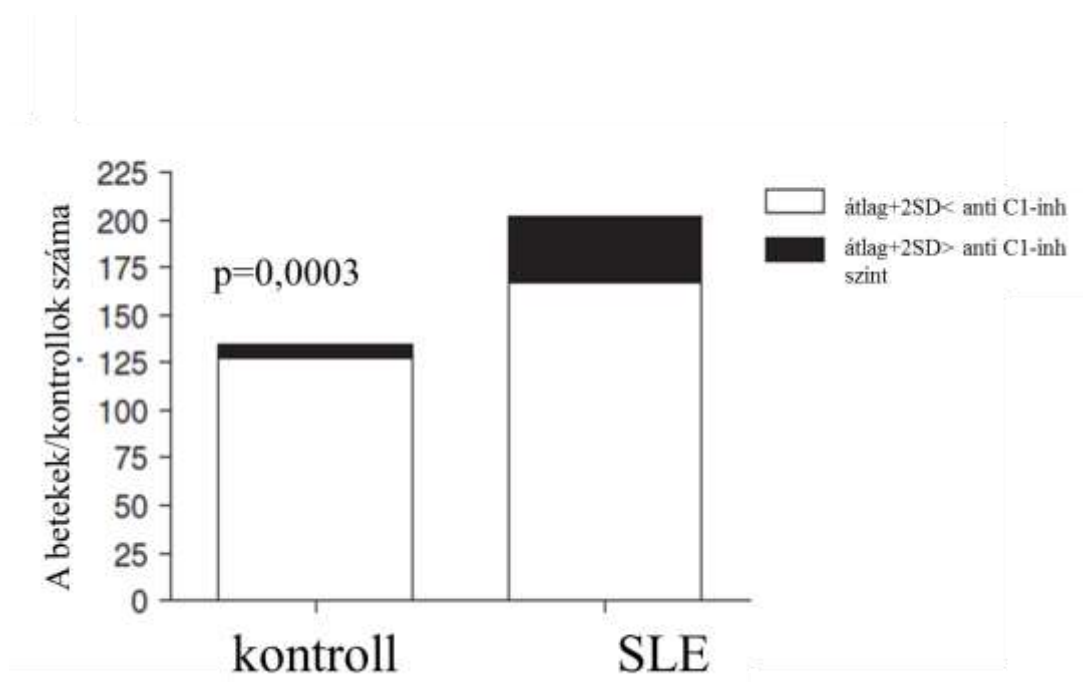
A citrullinált proteinek ellen termelődő antitestek mérése ELISA-módszerrel történik a napi gyakorlatban. Mivel RA-s betegek jelentős része ACPA-negatív (egy részük álnegatív), újabb peptideket tartalmazó tesztekre van szükség, így az ACPA-negatív betegek nem elhanyagolható részében kimutathatóak citrullinált proteinek elleni antitestek. A citrullinált peptidek biotinilációja eredményeink szerint alapvetően befolyásolhatja az antitestkötődést, amit érdemes figyelembe venni új módszerek beállításánál [137]. Az új diagnosztikus tesztek fejlesztésénél szükséges mind az N- mind a C-terminális biotiniláció hatását felmérni különböző hosszúságú linker régiók alkalmazásával, az antitest-kötődés optimalizálása érdekében. A napi gyakorlatban alkalmazott ACPA-, anti-MCV- és RF-tesztekkel negatív

eredményt adó minták közel fele pozitív reakciót adott az általunk szintetizált peptidekkel, így ezek a peptidek alkalmasak lehetnek a citrullinált proteinekkel reagáló antitesteket tartalmazó, de a rutin diagnosztikai módszerekkel álnegatív eredményt adó minták pontosabb azonosítására [138].

6.4. C1-inhibitor elleni autoantitestek SLE-ben

6.4.1. Fokozott C1-inhibitor elleni antitest-termelés SLE-ben

SLE-ben, különösen a betegség aktív szakaszában jellemző a komplementrendszer aktivációja [84] (lásd a 3.2.4.8. fejezetet is), a C1-inhibitor szintje jelentősen magasabb SLE-ben mint egészséges kontrollokban [85]. A poliklonális B-sejt-aktiváció szintén jellemző lupusban (lásd a 3.2.3.2. fejezetet is) és a következményes antitest-termelés illetve immunkomplekxképződés hozzájárul a komplementrendszer aktivációjához. Mindezek miatt vizsgáltuk a C1-inhibitor ellen termelődő antitestek szintjét. Az anti C1-inhibitor szérumszintje magasabb volt az SLE-s betegek mintáiban, mint az egészséges kontrollokéban ($p=0,034$) [141]. A kontrollok átlag + kétszeres szórás értékét meghaladó C1-inhibitor-szint ($0,4 \text{ U/ml}$) az SLE-s betegek 17,3 százalékában fordult elő ($p=0,0003$, a kontrollcsoporthoz képest) (13. ábra). Az anti-C1Q szérumszint nem tért el szignifikánsan a $0,4 \text{ U/ml}$ értéket meghaladó és az ennél kevesebb anti-C1-inhibitor-t tartalmazó SLE-s minták között. A SLEDAI-index alapján mért betegségaktivitás nagyobb volt, a betegségtartam hosszabb volt azokban a betegekben, akik szérummintáiban $0,4 \text{ U/ml}$ értéket meghaladó anti-C1-inhibitor-szintet mértünk ($p=0,048$ és $p=0,0004$). Az anti-C1-inhibitor-szint nem mutatott összefüggést az anti-DNS-antitest-szinttel és a bőr, ízületi vagy központi idegrendszeri érintettséggel.



13. ábra. A: Az átlag + kétszeres szórást meghaladó anti C1-inhibitor-szint a kontrollok és az SLE-s betegek körében [141].

6.4.2. Megbeszélés

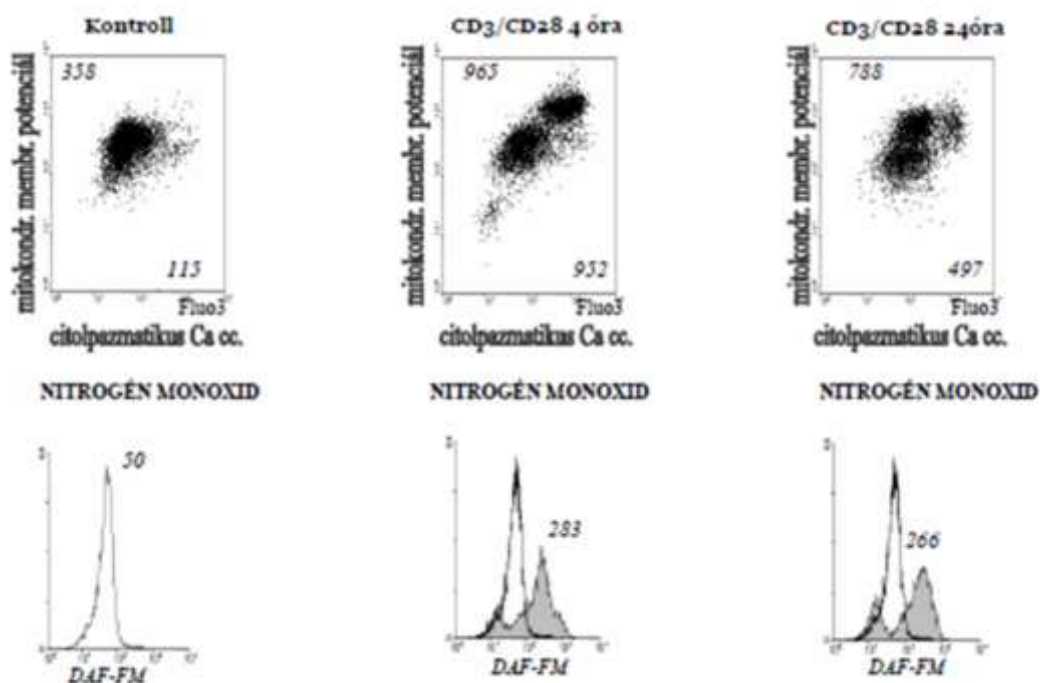
A megfigyelt fokozott anti-C1 inhibitor antitest-szint nem járt a C1-inhibitor hiány klinikai tüneteivel, a vizsgált betegek körében. A fokozott komplement aktiváció a C1-inhibitoron neoepitóp kialakulásához vezethet, hozzájárulva az antitest termelődéshez.

6.5. Az NO szerepének vizsgálata a T-lymphocyta-aktivációban

6.5.1. Az NO mitokondriális hiperpolarizációt indukál humán T-lymphocytákban

Az NO számos ponton szabályozza a gyulladást, termelése fokozott SLE-ben és RA-ban is (lásd a 3.2.4.7. fejezetet is) [65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74], szerepe a T-lymphocyta aktivációban nem ismert részleteiben. A mitokondriális membránpotenciál értéke fokozódik az apoptózis során (lásd a 3.2.4.3. fejezetet is) [46]. Feltételezhetőnek tűnt 2002-ben, az NO-val végzett kísérleteink kezdetén, hogy az NO hozzájárul a T-sejt-aktivációhoz és a mitokondriális hiperpolarizációhoz, ezért tanulmányoztuk a NO szerepét mindkét folyamatban.

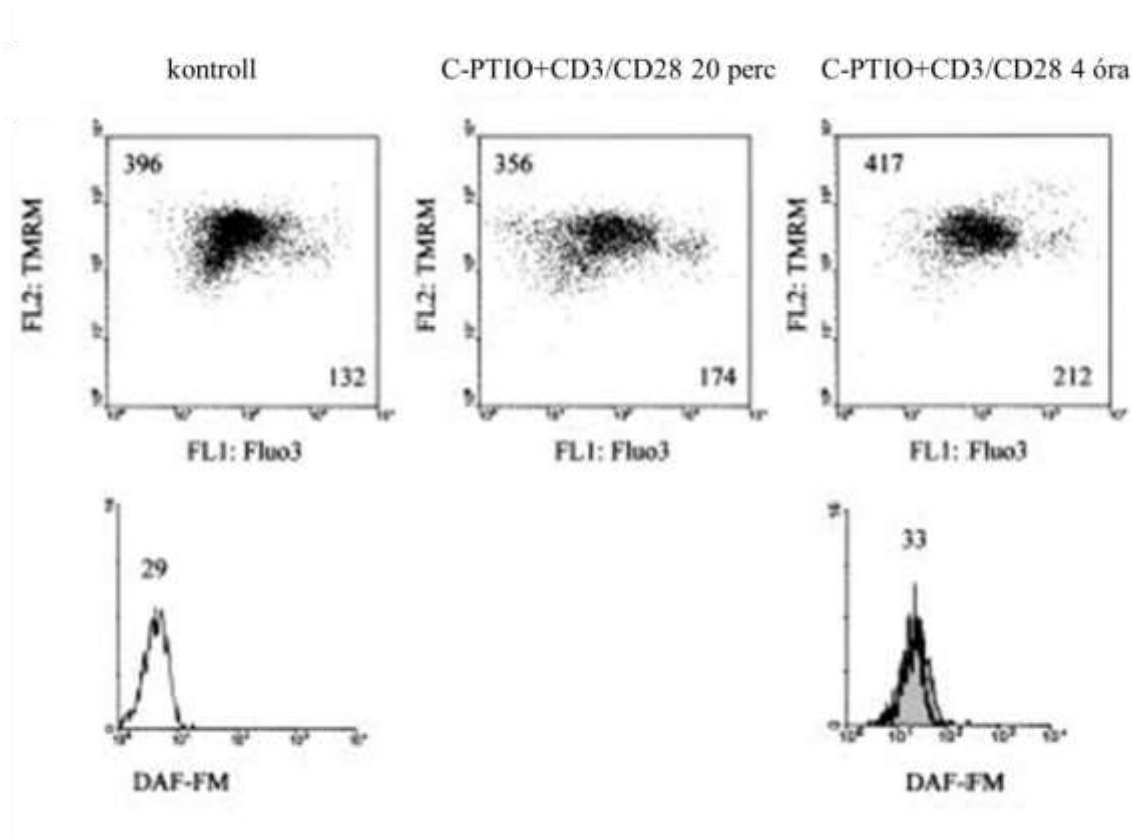
A T-lymphocyták CD3/CD28-stimulációja áramlási citometriával mérve a citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció-emelkedés mellett a mitokondriális membránpotenciál növekedésével, és NO-termeléssel járt ($p < 0,001$) (14. ábra) [121]. A mitokondriális membránpotenciált az elektromos gradiens változására érzékeny fluoreszcens festékekkel (DiOC6, JC-1 és TMRM) mértük (lásd az 5.5.3. fejezetet is). Az NO-szignál hasonló volt a CD45RA- és a CD45RO-sejtekben. A szuperoxid-diszmutázt mimikáló MnTBAP (300 μM) gátolta a CD3/CD28-stimulációra mérhető ROI-, NO- és Ca^{2+} -szignált, de nem befolyásolta a mitokondriális membránpotenciál növekedését.



14. ábra. Perifériás lymphocytákon 4 órás és 24 órás CD3/CD28-stimulációra mérhető citoplazmatikus és mitokondriális Ca^{2+} -szignál és NO-termelés [121].

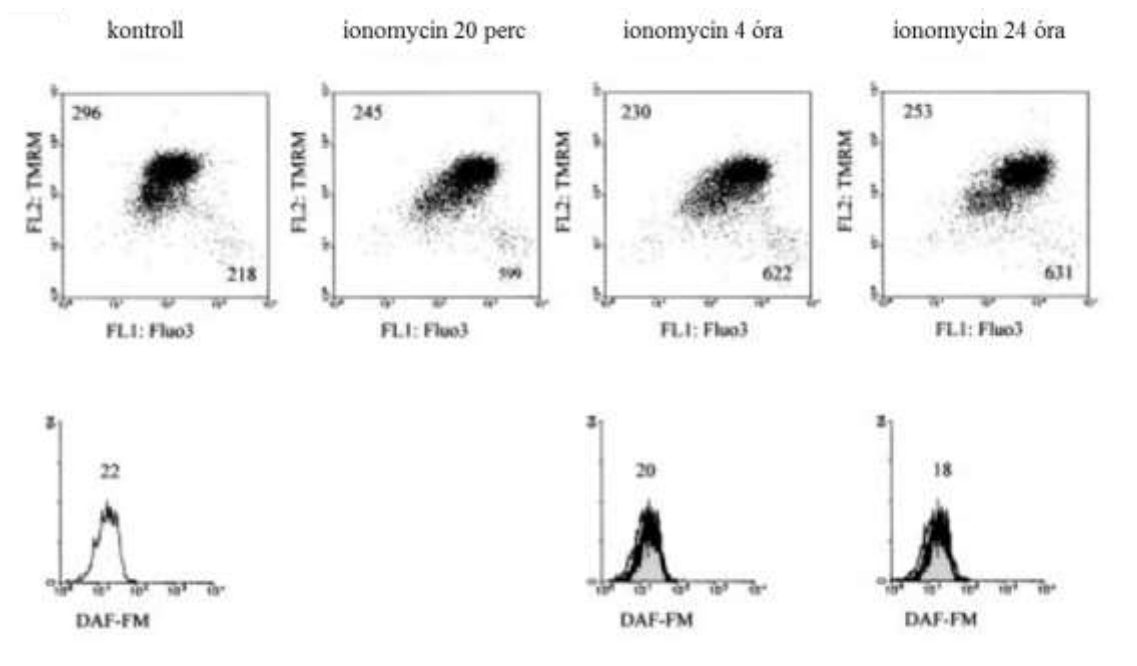
A membránpermeábilis IP3-blokkoló 2-APB (100 μM) gátolta a citoplazmatikus Ca^{2+} -, NO-, ROI-szignált és a mitokondriális hiperpolarizációt. Az NO-kelátor C-PTIO (500 μM) igen hatékonyan gátolta a CD3/CD28-stimulációra mérhető NO-, ROI- ($p = 0,01$), citoplazmatikus

($p < 0,001$) és mitokondriális Ca^{2+} -szignált ($p = 0,005$) és mitokondriális hiperpolarizációt ($p = 0,008$) (15. ábra).

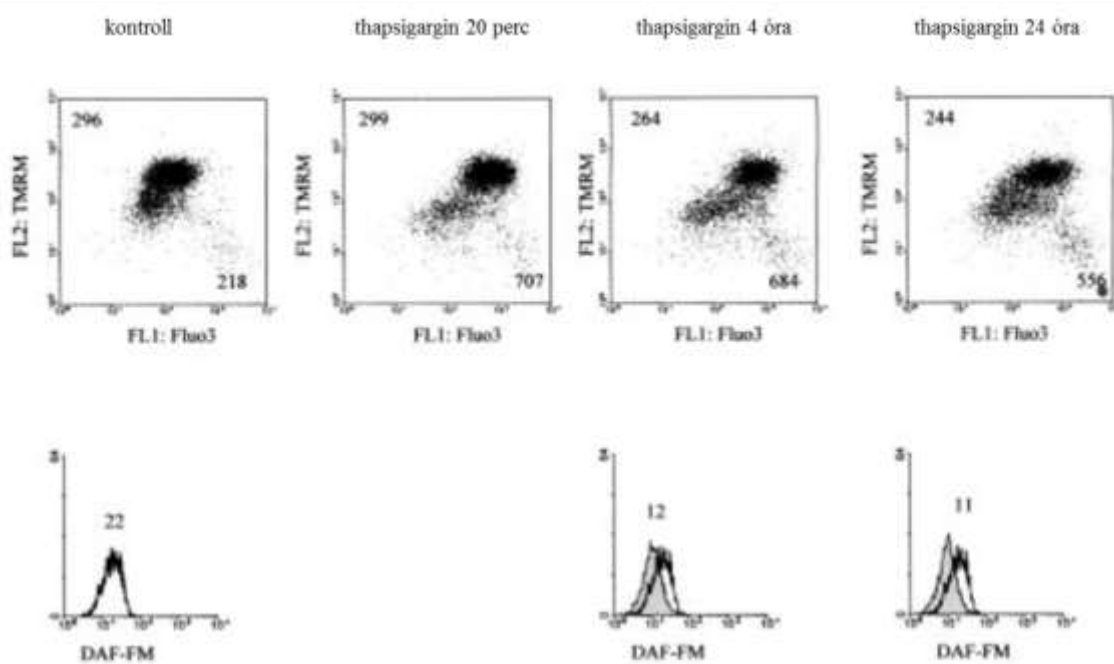


15. ábra. Az NO-kelátor C-PTIO hatása a T-sejt-aktivációra mérhető citoplazmatikus Ca^{2+} - és mitokondriális membránpotenciál-szignálra [121].

A Ca^{2+} -ionofor ionomycin ($2 \mu\text{M}$, 16. ábra) és az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATP-áz gátló thapsigargin ($1 \mu\text{M}$, 17. ábra) nem befolyásolta a lymphocyták mitokondriális membránpotenciálját és NO-termelését.

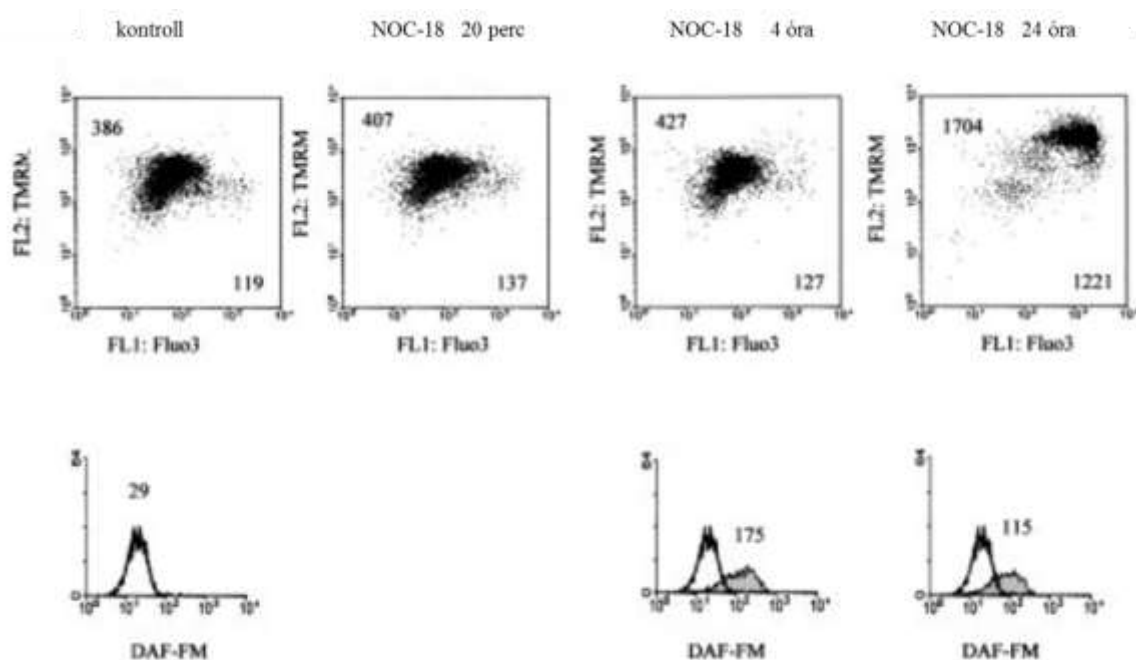


16. ábra. A ionomycin hatása a lymphocyták mitokondriális membránpotenciáljára és az NO-termelésre [121].



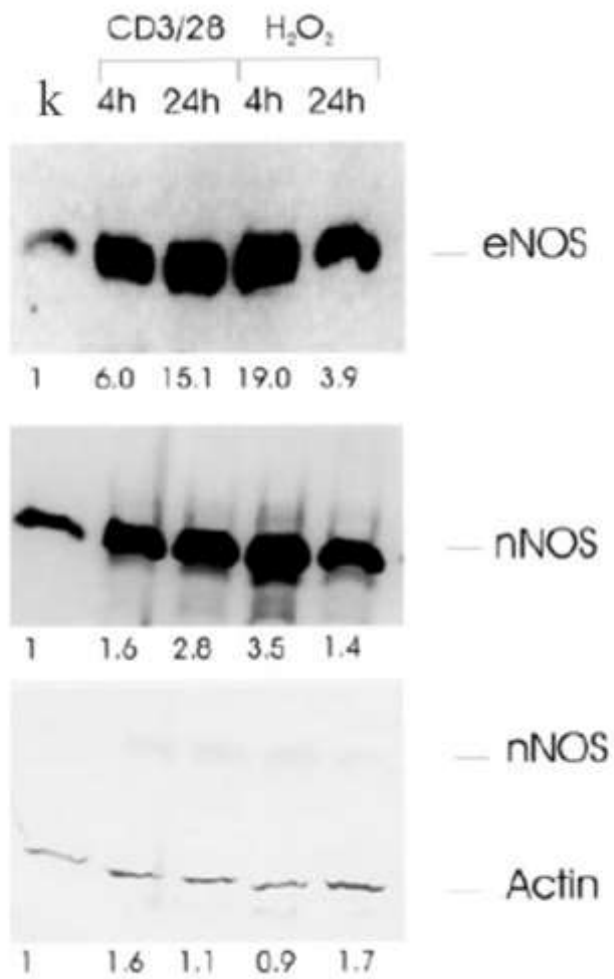
17. ábra. A thapsigargin hatása lymphocyták mitokondriális membránpotenciáljára és az NO-termelésre [121].

Az NO-donor NOC-18 600 $\mu\text{M/l}$ koncentrációban alkalmazva jelentősen fokozta mitokondrium-membránpotenciált ($p=0,002$), a citoplazmatikus és mitokondriális Ca^{2+} -szintet (**18. ábra**), csökkentette a luciferin-luciferáz módszerrel mért intracelluláris ATP-koncentrációt és nem befolyásolta a sejtek viabilitását.



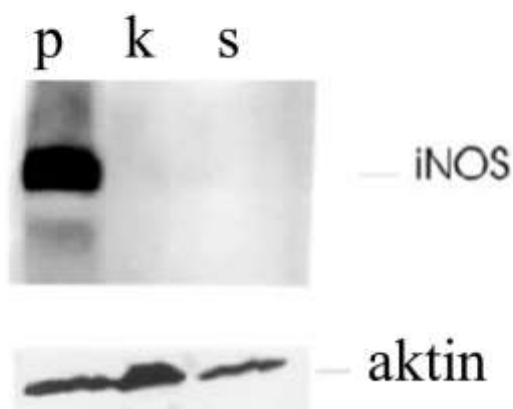
18. ábra. A NOC-18 hatása a mitokondriális membránpotenciálra és a citoplazmatikus Ca^{2+} -szintre [121].

A következő kísérletek során tanulmányoztuk az NO-szintetizáló NOS (lásd a 3.2.4.7. fejezetet is) enzimek kifejeződését lymphocytákban. Western blot módszerrel mérve humán T-lymphocytákban eNOS és nNOS expresszálódik, a T-sejt-aktiváció az eNOS- és nNOS-fehérjesszinteket 15-szörösére növeli (**19. ábra**), a mérésnél kontrollként aktint alkalmaztunk. 100 μM H_2O_2 -kezelés fokozta, míg ionomycin és thapsigargin nem befolyásolta az eNOS és az nNOS kifejeződését.



19. ábra. *T-lymphocyták nNOS- és eNOS-expressziója 4 órás és 24 órás CD3/CD28-stimulációra vagy 100 μ M H₂O₂-kezelés hatására, az aktinra normalizált denzitometriás értékek feltüntetésével [121].*

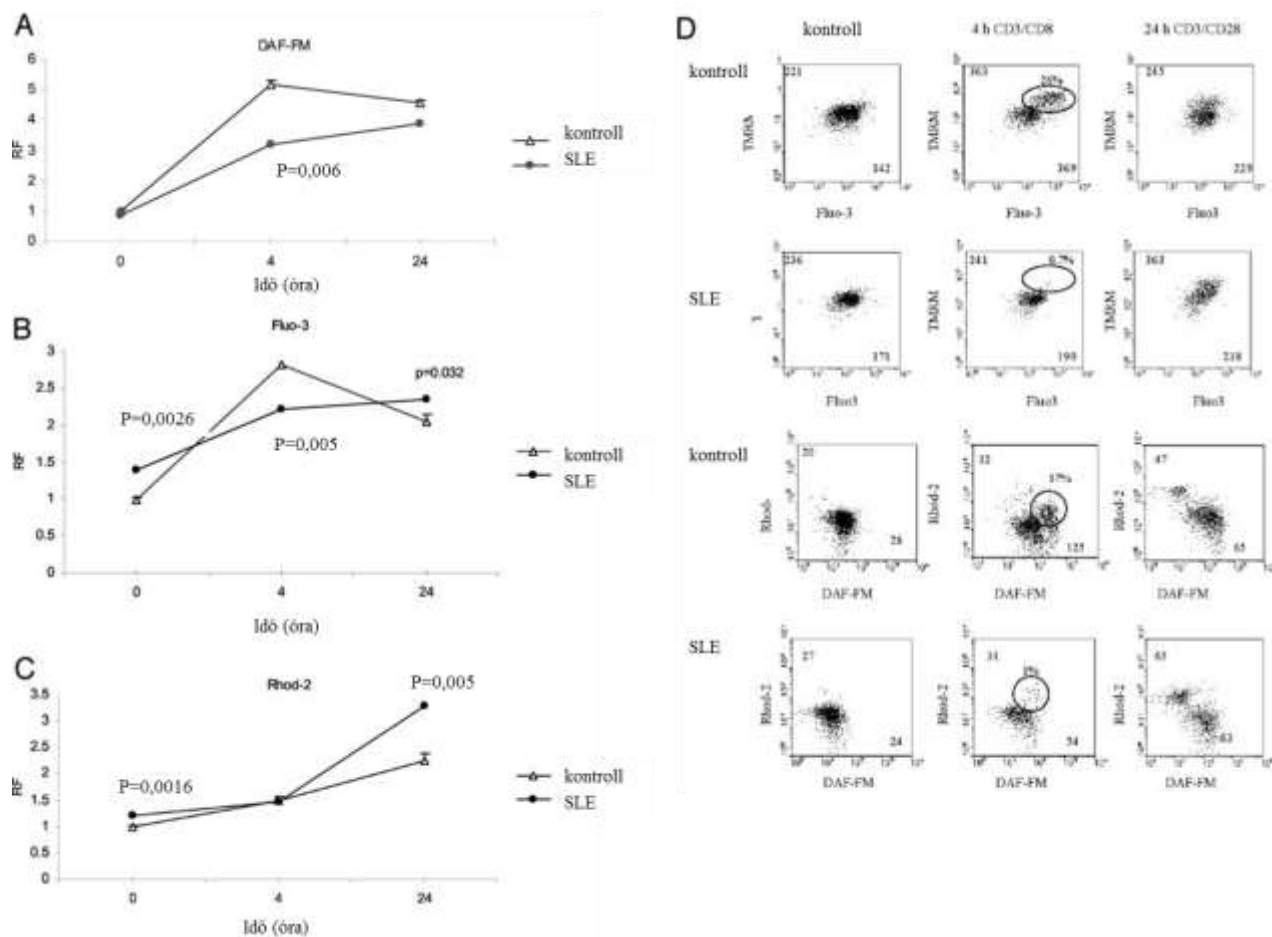
Az iNOS izoforma eredményeink szerint nem expresszálódott lymphocytákban (**20. ábra**).



20. ábra. T-lymphocyták iNOS-expressziója humán perifériás T-sejtek iNOS-protein-expressziója. *p: porcsejt (pozitív kontroll), k: nem stimulált sejtek, s: 24 órás CD3/CD28-stimuláció [121].*

6.5.2. Az NO által indukált mitokondrium-bioszintézis befolyásolja a Ca^{2+} szignált SLE-s betegek T-lymphocytáiban

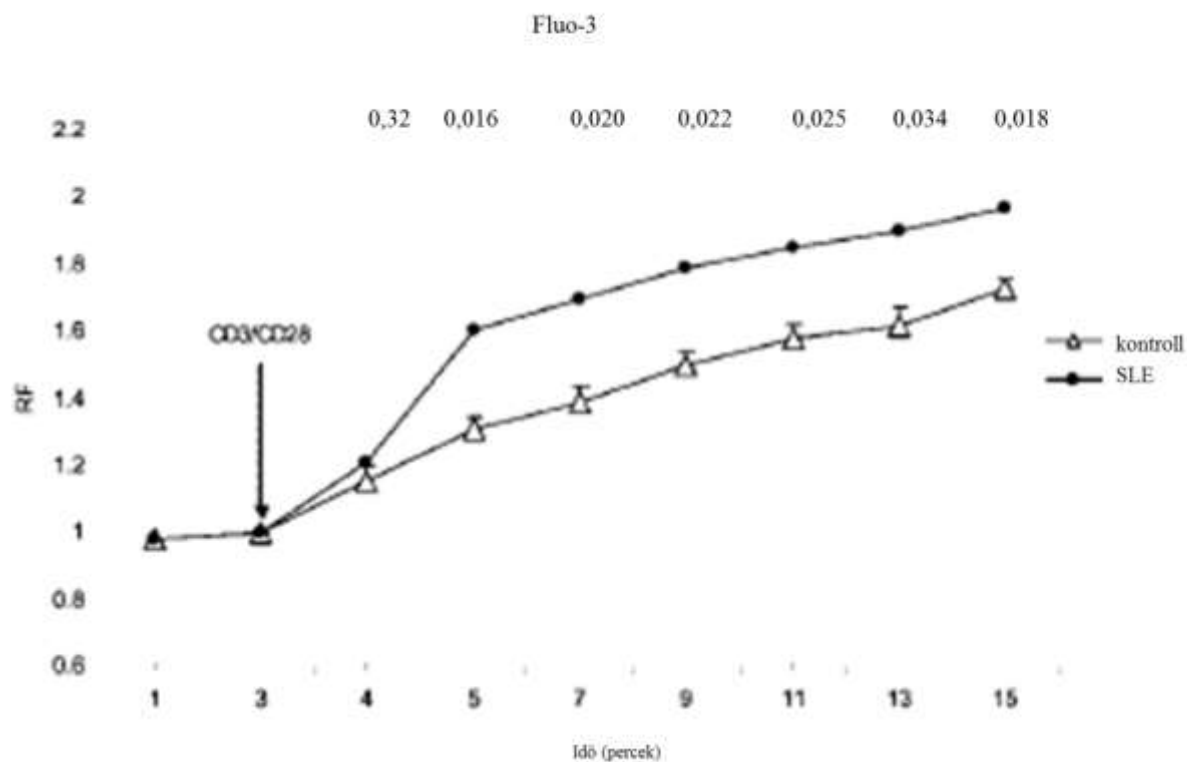
A mitokondrium-hiperpolarizáció a T-lymphocyta-aktiváció során megfigyelhető, NO-függő folyamat [121]. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján SLE-s betegek T-sejtjeiben tartós MHP mérhető [47], ezért tanulmányoztuk az NO szerepét SLE-ben [122]. Az SLE-s betegek és egészséges kontrollok T-lymphocytának nyugalmi NO-szintjében nem találtunk különbséget (**21. ábra, A-C panel**), ugyanakkor a sejtek citoplazmatikus és a mitokondriális Ca^{2+} -szintje magasabb volt SLE-ben ($p=0,026$ és $p=0,016$) [122]. A 4 óra CD3/CD28-stimulációra mérhető NO- és Ca^{2+} -szignál kisebb mértékű volt lupusban ($p=0,006$ és $p=0,005$). Négyórás T-lymphocyta-aktiváció hatására kontroll T-sejtek esetében megjelent egy magas mitokondriumpotenciállal és mitokondriális Ca^{2+} -szinttel jellemezhető, annexinnegatív sejtpopuláció (**21. ábra, D panel**), az SLE-s betegek esetében ez a sejtpopuláció jóval kevesebb sejtet tartalmazott.



21. ábra. SLE-s betegek és egészséges kontrollok T-lymphocytáinak áramlási citometriával mért, CD3/CD28-stimulációra mérhető NO- (DAF-FM), citoplazmatikus Ca²⁺ (Fluo-3)- és mitokondriális Ca²⁺ (Rhod-2)- szignálja [122].

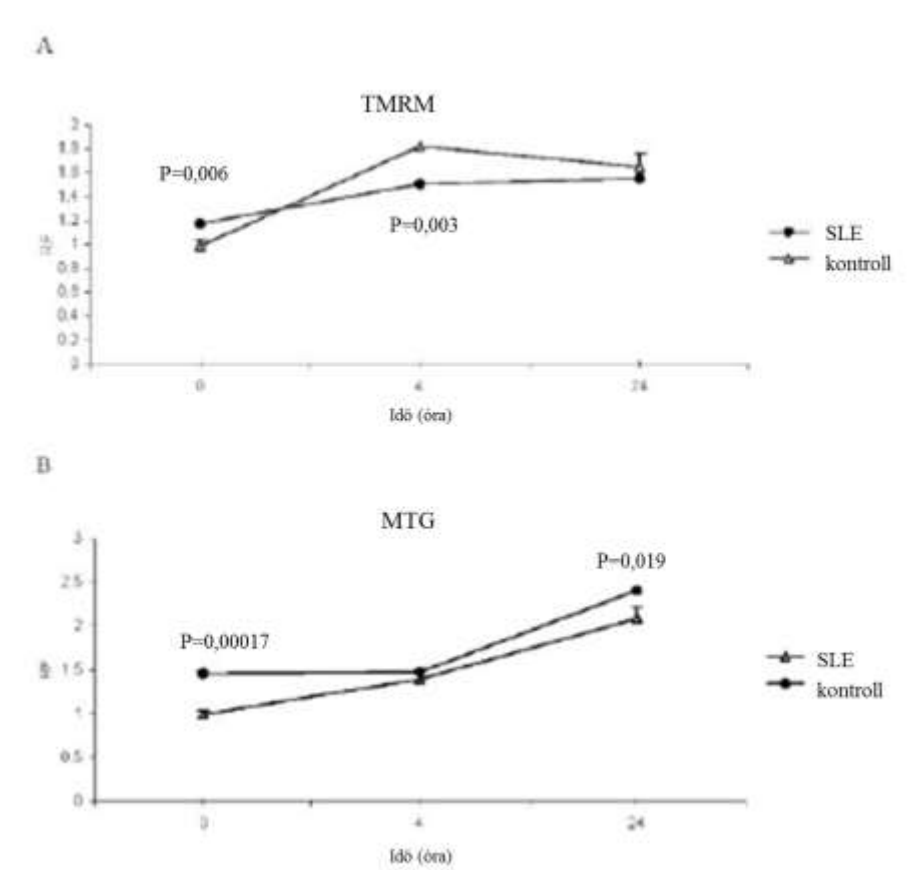
Eredményeink szerint tehát a nyugalmi citoplazmatikus és mitokondriális Ca²⁺-szint és a stimulációra mérhető fenntartott Ca²⁺-jel eltér SLE-s betegek T-sejtjein, a további kísérleteinkben vizsgáltuk a gyors Ca²⁺-szignált. A fenntartott Ca²⁺-szignállal ellentétben a CD3/CD28-stimulációt követő percekben a citoplazmatikus Ca²⁺-szint gyorsabban növekszik

SLE-s betegek T-lymphocytaiban, mint a kontrollsejtekben (22. ábra, lásd az 5.5.2. fejezetet is).



22. ábra. SLE-s betegek és egészséges kontrollok T-lymphocytainak CD3/CD28-stimulációra mérhető gyors citoplazmatikus Ca^{2+} -szignálja [122].

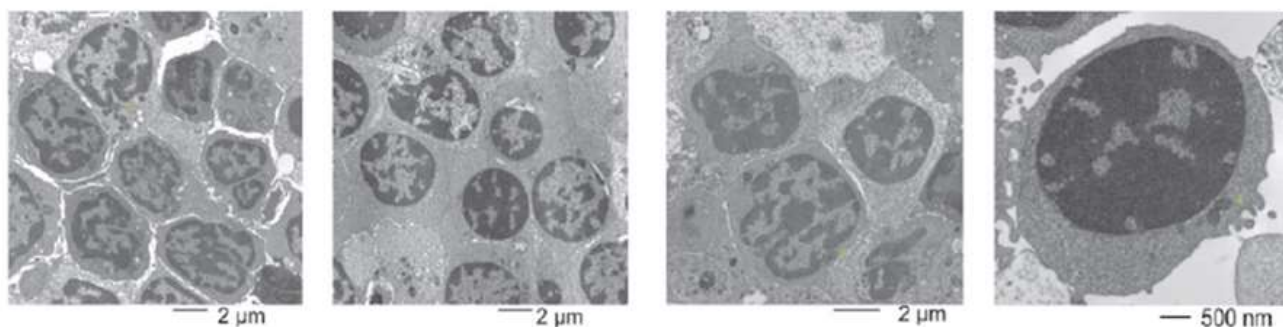
A mitokondriumok mennyiségét a membránpotenciálra nem érzékeny MTG- és NAO-festékekkel mértük (lásd az 5.5.3. fejezetet is). A mitokondriumok mennyisége (mitokondriális massa) SLE-s betegek T-sejtjeiben lényegesen több ($p=0,00017$), a membránpotenciál pedig magasabb ($p=0,006$), mint egészséges kontrollokéban (23. ábra).



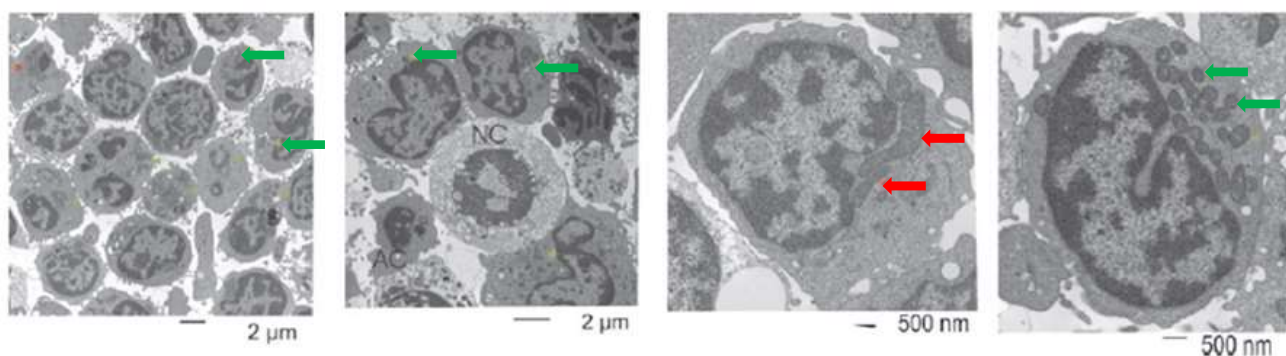
23. ábra. A mitokondrium membránpotenciáljának és méretének változása SLE-s betegek és egészséges kontrollok T-lymphocytáinak CD3/CD28-stimulációjára [122].

A továbbiakban elektronmikroszkópiával vizsgáltuk a mitokondriumok szerkezetét és mennyiségét T-sejtekben (lásd az 5.7.1. fejezetet is). Az SLE-s betegek T-lymphocytáiban szignifikánsan több és nagyobb mitokondrium volt, mint az egészséges kontrollokéban ($p=0,0009$) (24. ábra).

kontroll

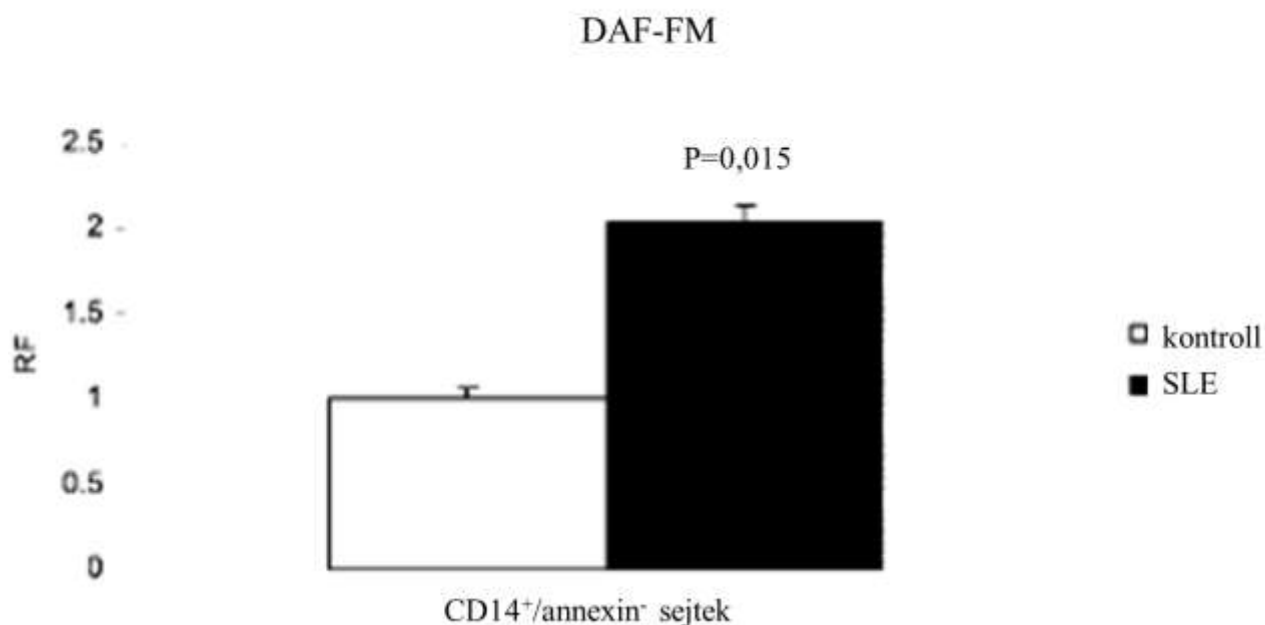


SLE



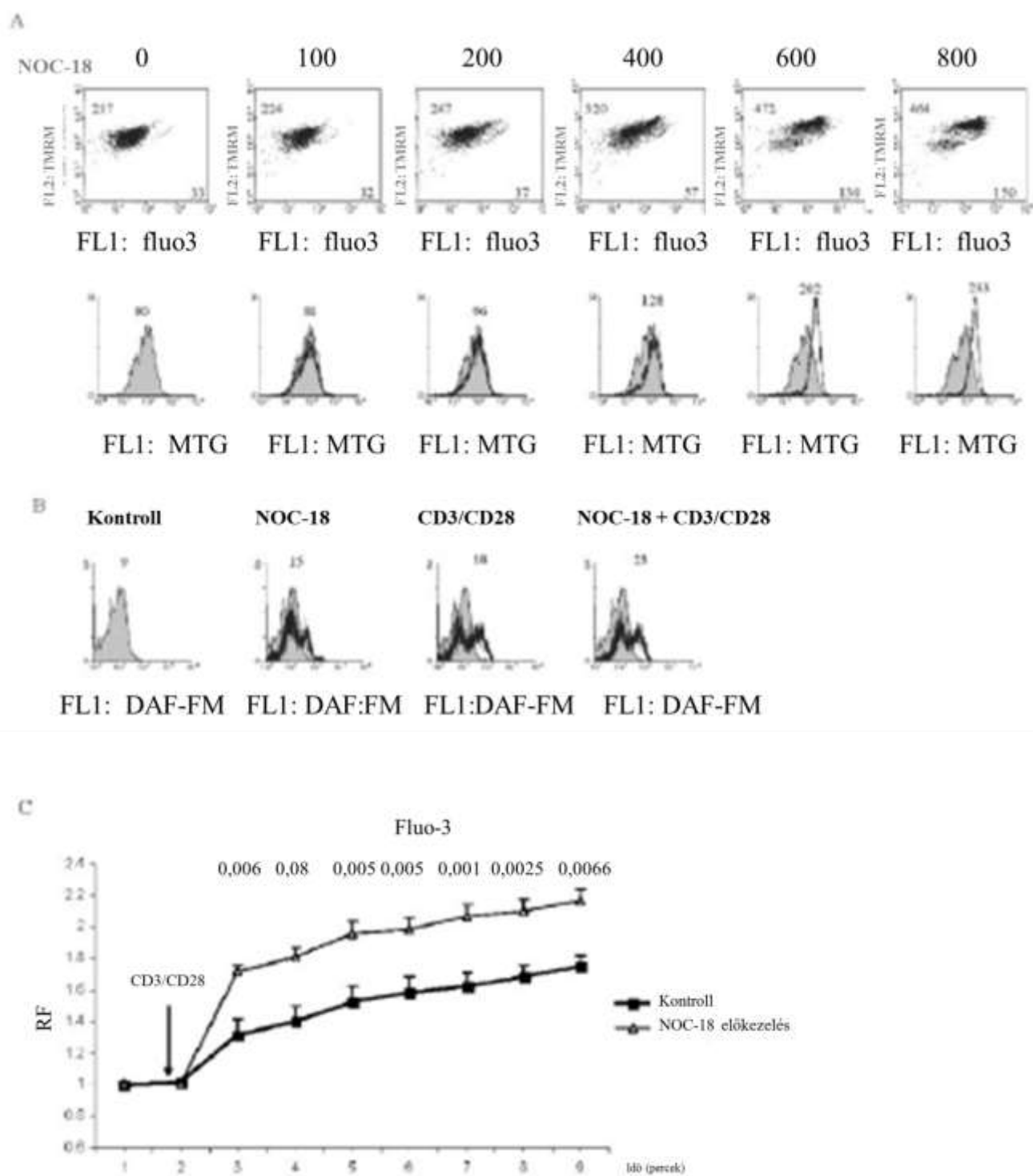
24. ábra. *SLE-s betegek és egészséges kontrollok T-lymphocytainak elektronmikroszkópos képe. A zöld nyilak normál méretű mitokondriumokra, a piros nyilak nagy méretű mitokondriumokra mutatnak. NC: nekrotikus sejt, AC: apoptotikus sejt [122].*

Kísérleteink során nem találtunk eltérést a vizsgált betegek és kontrollok lymphocytainak nyugalmi NO-termelésében, ugyanakkor a fokozott mitokondrium mennyiség és magasabb mitokondrium-membránpotenciál más sejtől származó NO következménye is lehet. B-lymphocyták, CD3⁻ és CD14⁻ sejtek NO-termelése nem tért el SLE-ben, a CD14⁺-monocyták ugyanakkor nagyobb mennyiségű NO-t termeltek mint a kontroll sejtek (**25. ábra**). SLE-s betegek monocytáit egészséges kontrollok T-lymphocytaival együtt inkubálva a lymphocyta cytoplazmatikus Ca²⁺-szintjének és mitokondriális membránpotenciáljának növekedését figyeltük meg. Ennek alapján feltételezhető, hogy a monocytákban fokozott mértékben termelődő NO a környező T-lymphocytaiba diffundál, szabályozva a mitokondrium-bioszintézist és -potenciált.



25. ábra. SLE-s betegek és egészséges kontrollok CD14⁺-monocytainak NO-termelése [122].

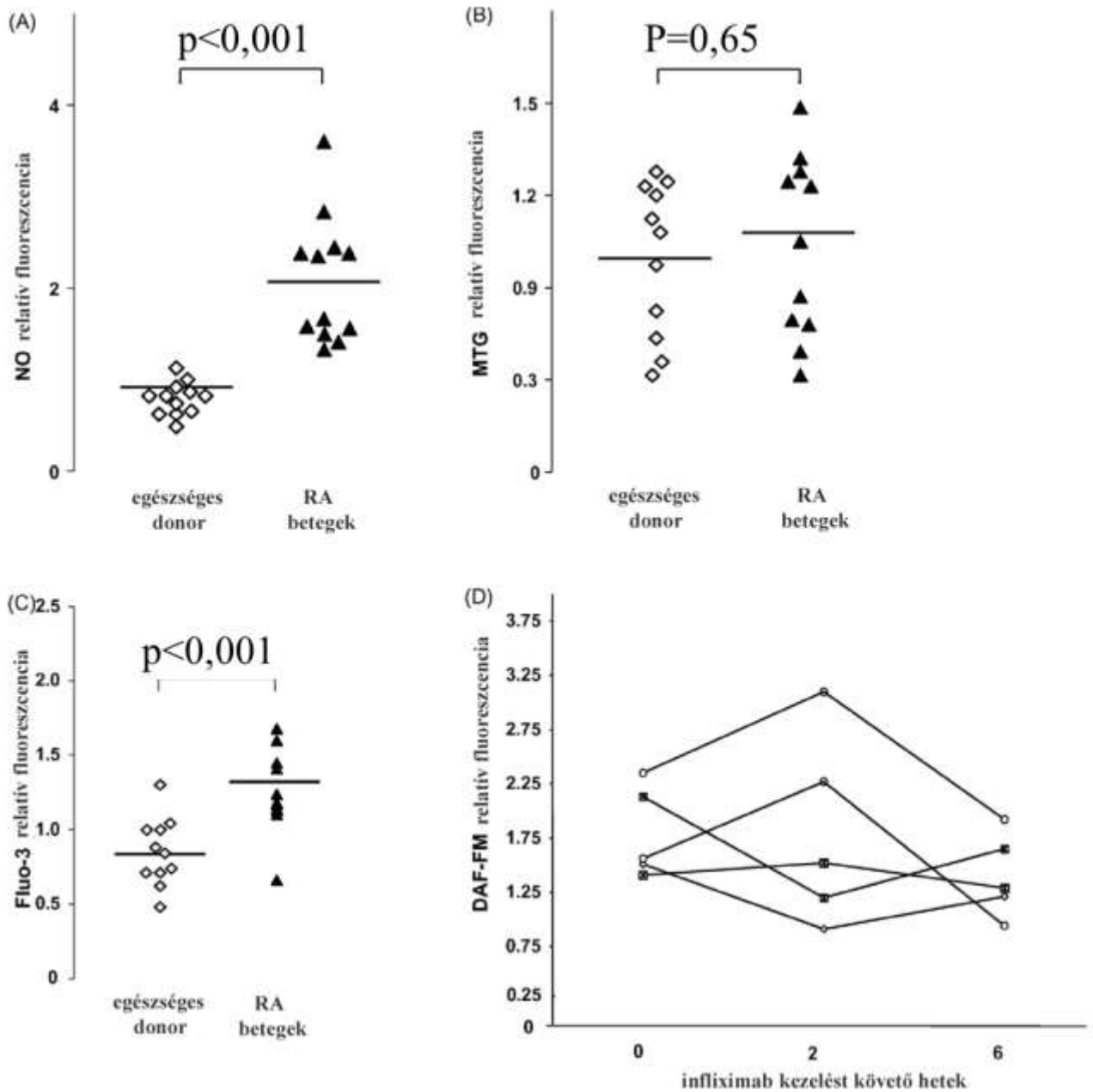
Az NO-emittáló NOC-18 (100-800 μ M) dózisfüggően emelte a T-sejtek citoplazmatikus Ca^{2+} -szintjét, a mitokondriális membránpotenciált és a növelte a mitokondriumok mennyiségét (**26. ábra, A panel**). 600 μ M NOC-18 a kontroll több mit kétszeresére növelte 24 óra alatt a mitokondriumok mennyiségét ($p=0,0009$). A következőkben azt tanulmányoztuk, hogy a fokozott NO-szintézis hozzájárulhat-e az SLE-s betegek T-lymphocytaín megfigyelt, az egészséges kontrollokétól eltérő Ca^{2+} -válaszhoz. A 200 μ M NOC-18-előkezelést követő NO- és Ca^{2+} -szignált és a **26. ábra B és C panel** mutatja. A NOC-18-előkezelést követő percekben a Ca^{2+} -szint-emelkedés gyorsabb volt, hasonlóan az SLE-s betegek lymphocytaín megfigyeltékhez (**22. ábra**).



26. ábra. NO-kezelés hatása a mitokondriális membránpotenciálra (TMRM), a mitokondrium mennyiségre (MTG) és a citoplazmatikus Ca^{2+} -szignálra (Fluo-3). Az NO-termelést DAF-FM fluoreszcens festékkel mértük [122].

6.5.3. A T-lymphocyták NO-termelése fokozott RA-ban

RA-ban az egészséges kontrollokénál magasabb a szérumnitrit- és nitrátszint [72, 73], mely fokozott NO-szintézisre utal. Az RA patogenezisében központi szerepet játszó T-lymphocyták [16, 17] aktivációját korábbi eredményeink alapján az NO szabályozza [121, 122], ezért vizsgáltuk a T-sejtek NO-termelését [123]. Eredményeink szerint az RA-s betegek T-lymphocytái által termelt NO több mint kétszerese az egészséges kontrollokénak ($p < 0,001$, **27. ábra, A panel**). Az NO a mitokondrium-bioszintézis egyik fő szabályozója, ezért mértük a mitokondriummenyiséget. Az RA-s betegek és az egészséges kontrollok T-sejtjeinek mitokondriummenyiségében nem találtunk eltérést (**27. ábra, B panel**, $p = 0,65$). Az SLE-ben megfigyeltékhez hasonlóan [122] az RA-s betegek T-sejtjeinek nyugalmi Ca^{2+} -szintje is magasabb az egészséges kontrollokénál ($p < 0,0001$; **27. ábra, C panel**). A betegségaktivitás nem korrelált a T-sejtek fokozott NO-szintézisével és fokozott nyugalmi Ca^{2+} -szintjével. Az *in vitro* TNF- α -kezelés dóziszfüggően fokozta a lymphocyták NO-termelését. Infliximabkezelésben részesülő RA-s betegek T-lymphocytáinak NO-termelését tanulmányoztuk a következőkben (**27. ábra D panel**). Két héttel az első infúziót követően nem találtunk érdemleges változást a lymphocyták NO-termelésében, a vizsgált öt betegből két esetben növekedett az NO-termelés. Ugyanakkor hat héttel az első infúziót követően az NO-termelés csökkent minden vizsgált mintában ($p = 0,005$).

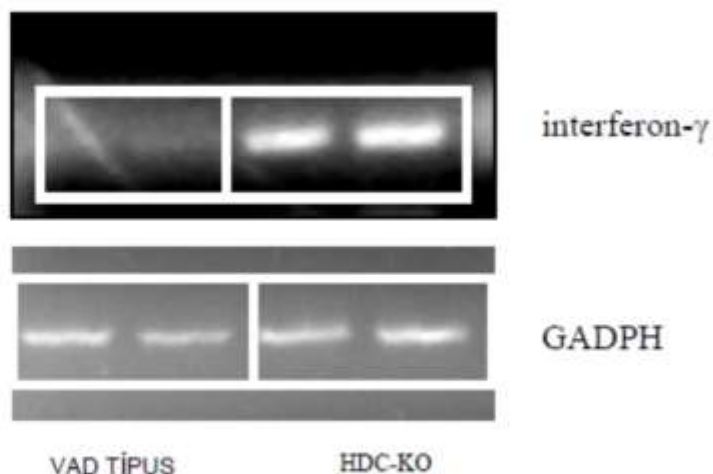


27. ábra. RA-s betegek és kontrollok T-lymphocytáinak NO-termelése (A); a mitokondriumok mennyisége (B); a citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció (C); NO-termelés TNF- α -blokkoló infliximabkezelés során [123].

6.5.4. Az NO szabályozza a HDC-KO egér T-sejtjeinek citokintermelését

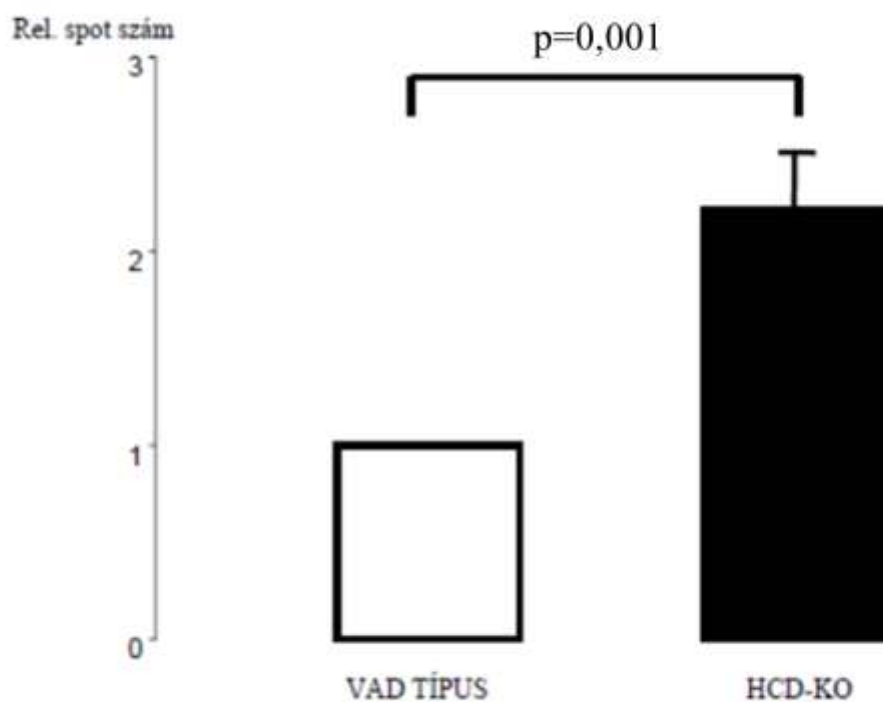
RA-ban a synovialis membránban jelentős mennyiségű hízósejt található [16, 17]. Mivel a hízósejtek vazoaktív anyagokat, így többek között hisztamint tartalmaznak, hozzájárulhatnak a synovialis gyulladásához. A hisztamintermelésért felelős egyetlen enzim a HDC. A hisztaminmentes diétán tartott HDC-KO egerekben vizsgálhatóak a hisztaminhiány immunrendszerre gyakorolt hatásai. A hisztamin szerepét a synovitis kialakulásában aggregán indukálta arthritis modellen, (lásd az 5.4.1. és 5.4.2. fejezetet is) HDC-KO egéren vizsgáltuk [130]. A kísérletes arthritis súlyosabb volt a HDC-KO egéren, mint a vad típusú állatban 10 héttel az aggregánnal történő első immunizációs oltást követően (a végtagvörösség és -duzzanat alapján számított kumulatív akut arthritis score $1,2 \pm 1,5$ és 0 ± 0 , $p=0,001$), a többi időpontot is figyelembe véve az arthritis súlyossága hasonlóan alakult a vizsgált csoportokban. Ezen eredményeink alapján a hisztaminhiány nem véd az aggregán indukálta arthritistől, további kísérleteinkben vizsgáltuk a hisztaminhiány hatását lymphocyták NO- és citokintermelésére.

Mivel korábbi publikációk alapján a hisztaminhiány a citokinháztartás Th1-irányú eltolódásával jár [81, 82], vizsgáltuk HDC-KO és vad típusú egerek lépsejtjeinek INF- γ -termelését [125]. RT-PCR módszerrel mérve (5.12.2. fejezet) a HDC-KO állatok lépsejtjeinek INF- γ mRNS-szintje nagyobb volt, mint a vad típusú állatok esetében ($p<0,001$, 28. ábra).



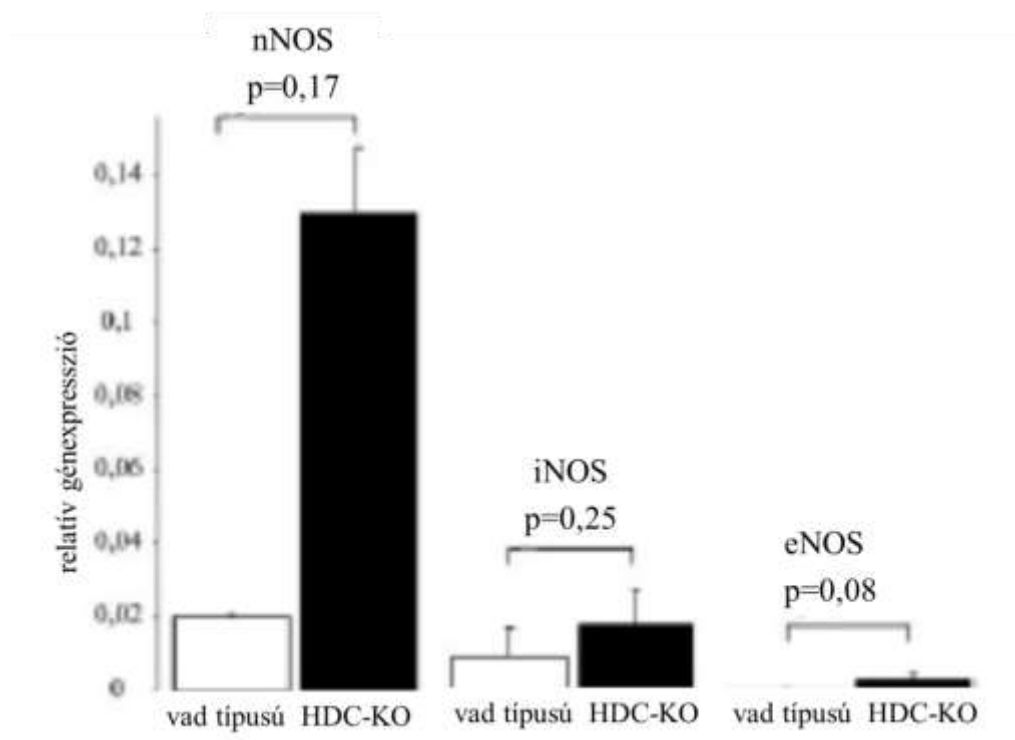
28. ábra. *HDC-KO és vad típusú egér lépsejtjeinek IFN- γ -termelése, reprezentatív RT-RCR [125].*

ELISPOT módszerrel (**5.10.2. fejezet**) mérve a Con-A-val stimulált HDC-KO lépsejtek IFN- γ -termelése szintén magasabb volt ($p=0,001$, **29. ábra**), mint a vad típusú állatból szeparált lépsejteké. A hisztaminhiányos és kontroll állatok lépsejtjeinek ELISPOT módszerrel mért IL-4- és IL-10-termelése között nem találtunk különbséget ($p=0,23$ és $p=0,4$).



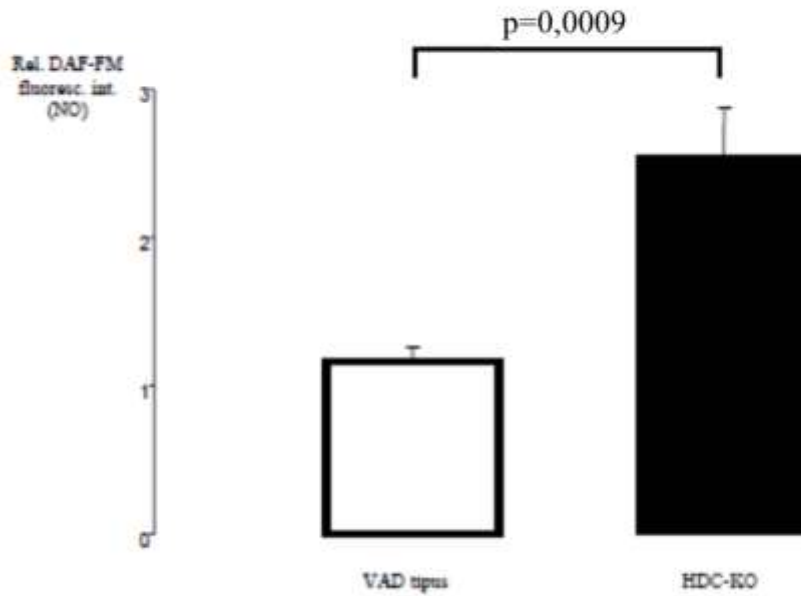
29. ábra. *Con-A-val stimulált HDC-KO és vad típusú egér lépsejtjeinek IFN- γ -termelése ELISPOT módszerrel mérve [125].*

A továbbiakban vizsgáltuk RT-PCR módszerrel a magnetikus szeparálással tisztított T-lymphocyták iNOS-, eNOS- és nNOS-expresszióját (**30. ábra**). Legnagyobb mennyiségben az nNOS fejeződött ki, kisebb mértékben az eNOS és az iNOS, nem találtunk szignifikáns különbséget a NOS enzimek kifejeződésében a vad típusú és a HDC-KO állatokból szeparált sejtek között.

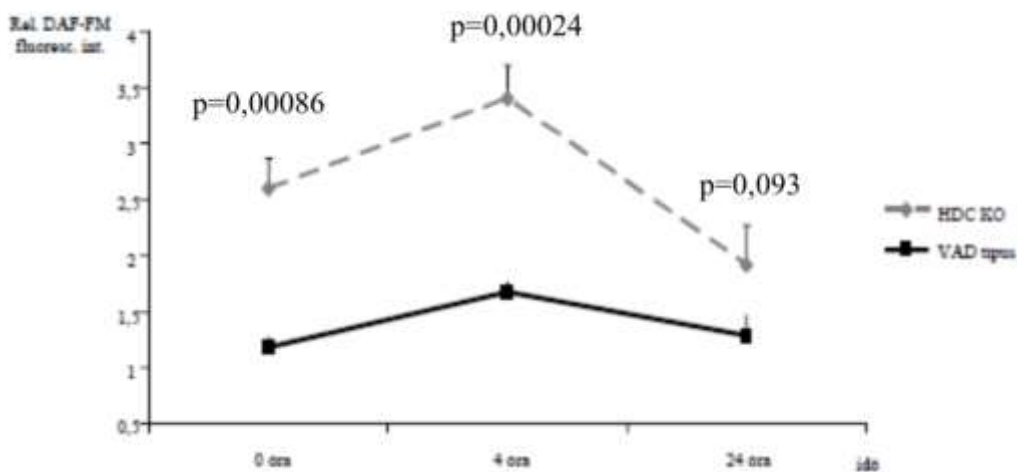


30. ábra. *Magnetikus szeparálással tisztított T-lymphocyták iNOS-, eNOS- és nNOS-expressziója, RT-PCR módszerrel mérve [125].*

HDC-KO állat T-lymphocytái nagyobb mennyiségű NO-t termelnek és a Con-A stimulációra nagyobb ezekben a sejtekben a Ca^{2+} -szignál, mint a vad típusú állatból szeparált sejtekben ($p=0,0009$; **31. ábra**, és $p=0,00024$, **32. ábra**).

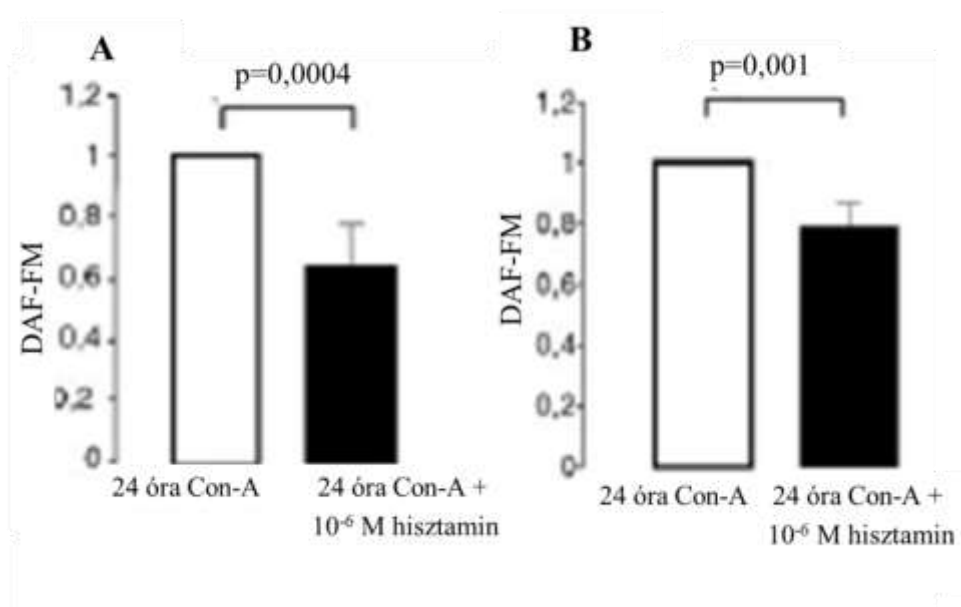


31. ábra. HDC-KO és vad típusú egér T-lymphocytáinak NO-termelése, áramlási citometriával mérve. Az átlag \pm SEM értékek ábrázolva [125].



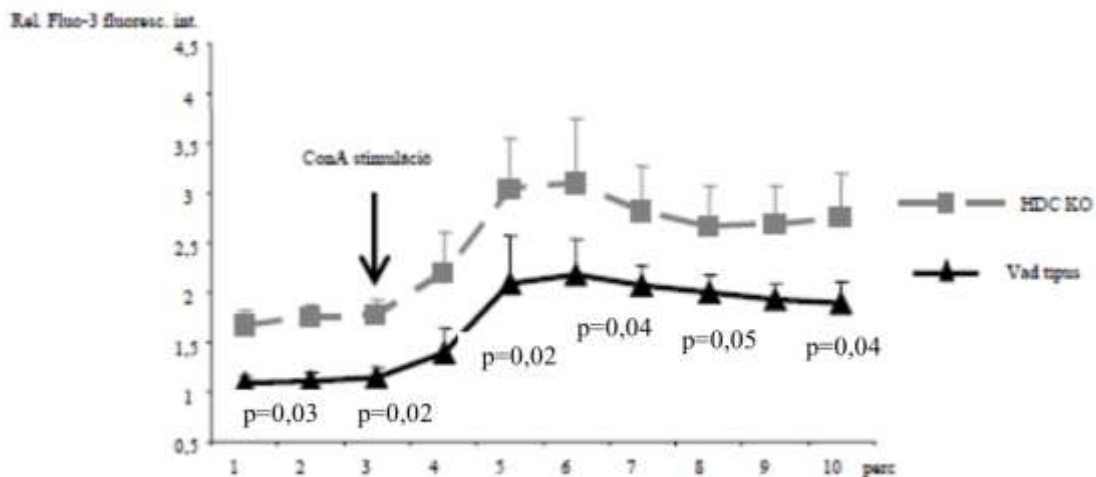
32. ábra. HDC-KO és vad típusú egér T-lymphocytáinak Con-A-stimulációra mérhető NO-termelése [125].

Ezt követően vizsgáltuk hisztamin hatását Con-A-val stimulált sejtek NO termelésére. A HDC-KO és a vad típusú állatok T-lymphocytáinak Con-A indukálta NO-termelése gátolható volt 10^{-6} M hisztaminkezeléssel (**33. ábra**). A szérumnitrát- és nitritszintben (**5.11. fejezet**) nem volt különbség a HDC-KO és a vad típusú állat között.



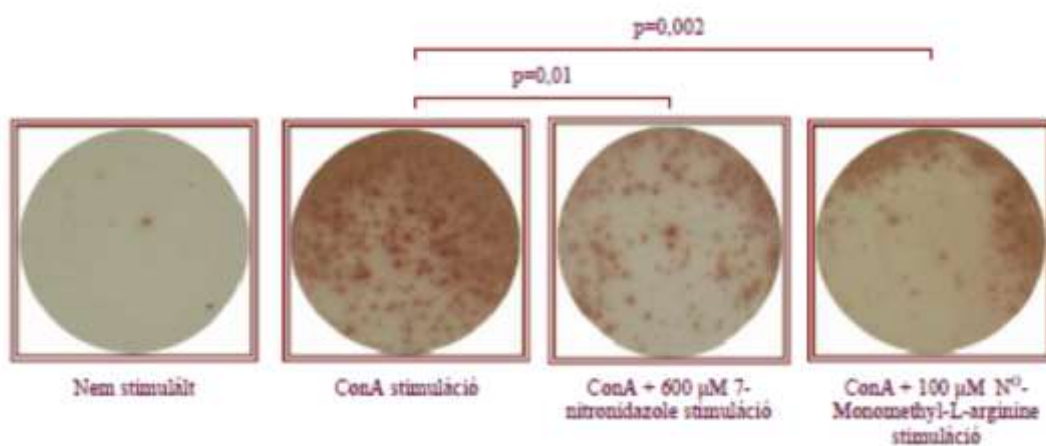
33. ábra. *HDC-KO (A) és vad típusú (B) egér T-lymphocytáinak Con-A-stimulációra mérhető NO-termelése. Az átlag \pm SEM értékek ábrázolva [125].*

A citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció nagyobb volt HDC-KO egér T-sejtjeiben, míg a Con-A-stimulációra mérhető Ca^{2+} -szignál hasonló volt a hisztaminhiányos egér és a vad típusú egér sejtjeiben (**34. ábra**).



34. ábra. *HDC-KO és vad típusú egér T-lymphocytáiban Con-A-stimulációra mérhető Ca^{2+} -szignál [125].*

A Con-A-kezelés által indukált IFN- γ -termelés gátolható volt 10 μ M membránpermeabilis BAPTA-AM-előkezeléssel. Lépsejteket 600 μ M NOC-18-cal 24 órán át kezelve fokozódott a Con-A indukálta IFN- γ -termelés ($p=0,0002$). HDC-KO lépsejtek NO-gátló nitronidazol (600 μ M) és N^G monometil L arginin (100 μ M) -kezelése gátolta az ELISPOT módszerrel mért IFN- γ -termelést ($p=0,01$; $p=0,002$, **35. ábra**). Ugyanakkor lépsejtek hisztaminkezelése nem befolyásolta az IFN- γ -termelést.



35. ábra. *Nitronidazol és N^G -monometil-L-arginin hatása HDC-KO lépsejtek IFN- γ -termelésére [125].*

A szérumban L-hisztidin-szintjében nem találtunk különbséget a HDC-KO és a vad típusú állat között tömegspektrometriával mérve ($p=0,39$, **5.8. fejezet**). Korábbi adataink szerint az NO szabályozza a lymphocyták mitokondrium-bioszintézisét. A HDC-KO és a vad típusú egerek T-sejteinek mitokondriumtartalmában és ROI-termelésében nem találtunk szignifikáns különbséget, 24 órás Con-A-stimulációt követően a ROI-szignál a vad típusú egerek lymphocytáiban nagyobb mértékű volt ($p=0,016$).

6.5.5. Megbeszélés

Az NO alapvető szerepet játszik a gyulladásos folyamatok szabályozásában, szisztémás autoimmun betegségekben, így SLE-ben és RA-ban is fokozott NO-termelésről számoltak be [72, 73, 74, 157, 158, 159]. Az NO több ponton szabályozza a mitokondriumműködést: gátolja a citokróm-oxidázt [69], fokozza a mitokondrium-bioszintézist [71], sejttípustól, és koncentrációjától függően gátolhatja és serkentheti is az apoptózist [68, 160]. Munkánk során tanulmányoztuk az NO szerepét a T-lymphocyta-aktivációban fiziológiai körülmények között, SLE-ben, RA-ban és HDC-KO egérben [121, 122, 123, 125].

A nagy energiájú foszfátot tartalmazó ATP az emlős sejtek legfontosabb energiaforrása. A citoplazmában történik a glikolízis, míg az ATP-szintézis jóval hatékonyabb formája, az oxidatív foszforiláció a mitokondriumban zajlik. A sejtek által felhasznált energia körülbelül 95 százalékát a mitokondrium szolgáltatja. A T-lymphocytaaktiváció során nő a sejt energiafelhasználása, amit jelentős részben a mitokondriumok fokozott ATP-termelése tesz lehetővé. A mitokondrium belső membránjának két oldalán az energia átmeneti tárolására szolgáló elektrokémiai gradiens alakul ki, mely megközelítően 180 mV. Az elektrokémiai gradiens hatására a protoncsatornán keresztül protonok kerülnek a mártixba, a folyamat során ATP szintetizálódik [69, 70]. A citoplazmatikus Ca^{2+} -oszcillációhoz hasonló Ca^{2+} -szignálok hatására a szuszpenzióban tartott mitokondriumok Ca^{2+} -ot akkumulálnak, a mitokondriális Ca^{2+} az oxidatív foszforilációt serkenti [161, 162, 163]. IP₃-agonistával jelentős mitokondriális Ca^{2+} -szint-emelkedés váltható ki, kismértékű citoplazmatikus Ca^{2+} -szignál mellett is. A mitokondriumok az endoplazmatikus retikulum szomszédságában helyezkednek el elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján, így a Ca^{2+} -raktárak ürülése mitokondriális Ca^{2+} -akkumulációt eredményezhet, befolyásolva ezzel a citoplazmatikus Ca^{2+} -szignált [164, 165].

A T-sejt-stimuláció citoplazmatikus Ca^{2+} -, NO-, ROI-szignált és mitokondriális hiperpolarizációt indukál. Az IP3 az endoplazmatikus retikulumon lévő receptorához kötődve a belső raktárakból Ca^{2+} -ürülést eredményez. A membránpermeábilis IP3-receptor-antagonista 2-APB és az NO-kelátor C-PTIO gátolja a T-sejt-aktivációra mérhető NO-szignált, Ca^{2+} -szignált és mitokondriális hiperpolarizációt. Eredményeink alapján az NO hozzájárul a T-lymphocyta-aktivációhoz [121].

Az apoptózis késői fázisára jellemző a membránpotenciál összeomlása, amit átmenetileg fokozott MMP előz meg [46]. Az IL-10, IL-3, TGF- β 1, IFN- γ és az anti-Fas antitestek által indukált apoptózist megelőzően szintén mitokondriális hiperpolarizáció alakul ki [46, 166, 167, 168, 169]. Érdekes módon SLE-s betegek T-sejteiben tartósan magasabb MMP és ATP-depléción mérhető [47]. SLE-s betegek T-sejtjein a sejthalált indukáló hatásokra az apoptózis helyett jellemzően nekrozis alakul ki, amely összefüggésben lehet a csökkent ATP-szinttel. Az oxidatív foszforiláció során keletkezhetnek ROI-k, a mitokondriumok a ROI-k fő forrását képezik. A ROI-k intracelluláris hatásai közé tartozik a lipidperoxidáció, károsíthatják a DNS-t, a membránokat, így a mitokondriumokat is. Az MMP és a mitokondriális Ca^{2+} -szint szabályozza a mitokondriális ROI-termelést. SLE-ben a T-sejtek ROI-termelése fokozott az egészséges kontrollokéhoz képest [47]. Az SLE-s betegek T-sejtjein megfigyelhető mitokondriális hiperpolarizáció és ATP-depléción a mitokondriális Ca^{2+} -homeosztázis zavarára utal. Eredményeink szerint SLE-s betegekből szeparált T-lymphocyták mitokondriális Ca^{2+} -szintje magasabb, mint az egészséges kontrollokból szeparált sejteké.

Vassilopoulos és munkatársai megfigyelései szerint SLE-s betegekből szeparált T-sejtekben az aktivációra nagyobb mértékű és gyorsabb Ca^{2+} -szignál mérhető az aktivációt követő percekben, mint egészséges kontrollok mintáiban. Megfigyeléseik szerint a Ca^{2+} -szignáletérés nem mutatott korrelációt a betegség aktivitásával vagy szervi érintettséggel [170]. Az SLE-s betegek T-sejtjein megfigyelt ATP-deplécióban, mitokondriális hiperpolarizációban, a fokozott gyors és csökkent fenntartott Ca^{2+} -szignálban szerepe lehet a magasabb mitokondriális Ca^{2+} -szintnek [122].

Számos korábbi megfigyelés utal az NO patológiás szerepére SLE-ben és RA-ban. SLE-s betegek szérumában a nitrítszint magasabb, mint egészséges kontrollokéban, a szérumnitrátszint korrelál az anti-DNS-szinttel és a betegség aktivitásával [171]. IFN- γ és

LPS hatására *in vitro* az MRL/*lpr* egér lépsejtjei és peritoneális sejtjei több NO-t termelnek, mint a kontroll állatok sejtjei. A nem specifikus NOS-inhibitor N^G-monometil-L-arginin és az iNOS-specifikus inhibitor L-N6-1-iminoetil-lizin gátolta a glomerulonephritist és az arthritist MRL-*lpr/lpr* egéren [172]. Az MRL/*lpr* iNOS génkiütött egérben ugyanakkor hasonló veseérintettség alakul ki, mint a vad típusú állatban [173]. RA-ban szintén magasabb a szérumnitritszint a kontrollokénál, egyes megfigyelések szerint a nitritszint korrelál a betegség aktivitásával és a radiológiai progresszióval, míg mások hasonló korrelációt nem találtak [73, 174]. A mycophenolat mofetil részben az NO-termelés gátlásán keresztül fejti ki immunuszuppresszív hatását [175, 176]. A synovitis során számos sejtípus, így osteoclastok, osteoblastok, makrofágok, fibroblastok, neutrophil granulociták és endotheliális sejtek is termelhetnek NO-t [177]. Eredményeink szerint RA-s betegek T-lymphocytaínak az egészséges kontrollokénál magasabb az NO-termelése, TNF- α -blokkoló kezelés során az NO-termelés csökken [123]. A mitokondriális membránpotenciál tartósan magas SLE-s betegek T-sejteiben, míg RA-s betegek T-lymphocytaíban az egészséges kontrollokéhoz hasonló [47].

Korábbi megfigyelésekhez hasonlóan a mi eredményeink alapján is hisztamin hiányában fokozott IFN- γ -szintézis figyelhető meg [81, 82, 125]. A HDC-KO T-lymphocytaíban magasabb nyugalmi Ca²⁺-szintet mértünk, mint a vad típusú állatból szeparált sejtekben [125], hasonlóképpen az SLE-ben és RA-ban leírtakkal [122, 123], a fokozott NO-termelés hozzájárulhat a magasabb nyugalmi Ca²⁺-szinthez. Ugyanakkor a HDC-KO T-sejtek fokozott NO-termelése az RA-s betegeken megfigyeltékhez hasonlóan nem jár megnövekedett mitokondrium-bioszintézissel [125]. Az SLE-ben tapasztalt nagyobb mitokondrium mennyiség feltehetően a monocytákból származó nagyobb mennyiségű NO következménye [122]. T-lymphocytaí NO-termelése SLE-ben hasonló volt a kontroll sejtekéhez, ugyanakkor RA-ban és a HDC-KO egér T-sejtjeiben a kontrollokéhoz képest fokozott NO-termelést figyeltünk meg [122, 123, 125]. Az iNOS enzim monocytákból jelentős mennyiségben expresszálódik, nagyobb mennyiségű NO-t termel, mint a lymphocytaíban kifejeződő eNOS és nNOS, ez lehet a magyarázata a fokozott NO-termelés mellett tapasztalt eltérő mitokondrium-bioszintézisnek. A Ca²⁺ felvételére, raktározására és ürítésére képes mitokondriumok mennyisége befolyásolhatja a citoplazmatikus Ca²⁺-szignált, az SLE-ben megfigyelt fokozott gyors és csökkent fenntartott Ca²⁺-szignál elsősorban a megnövekedett mitokondrium mennyiség következménye lehet [178].

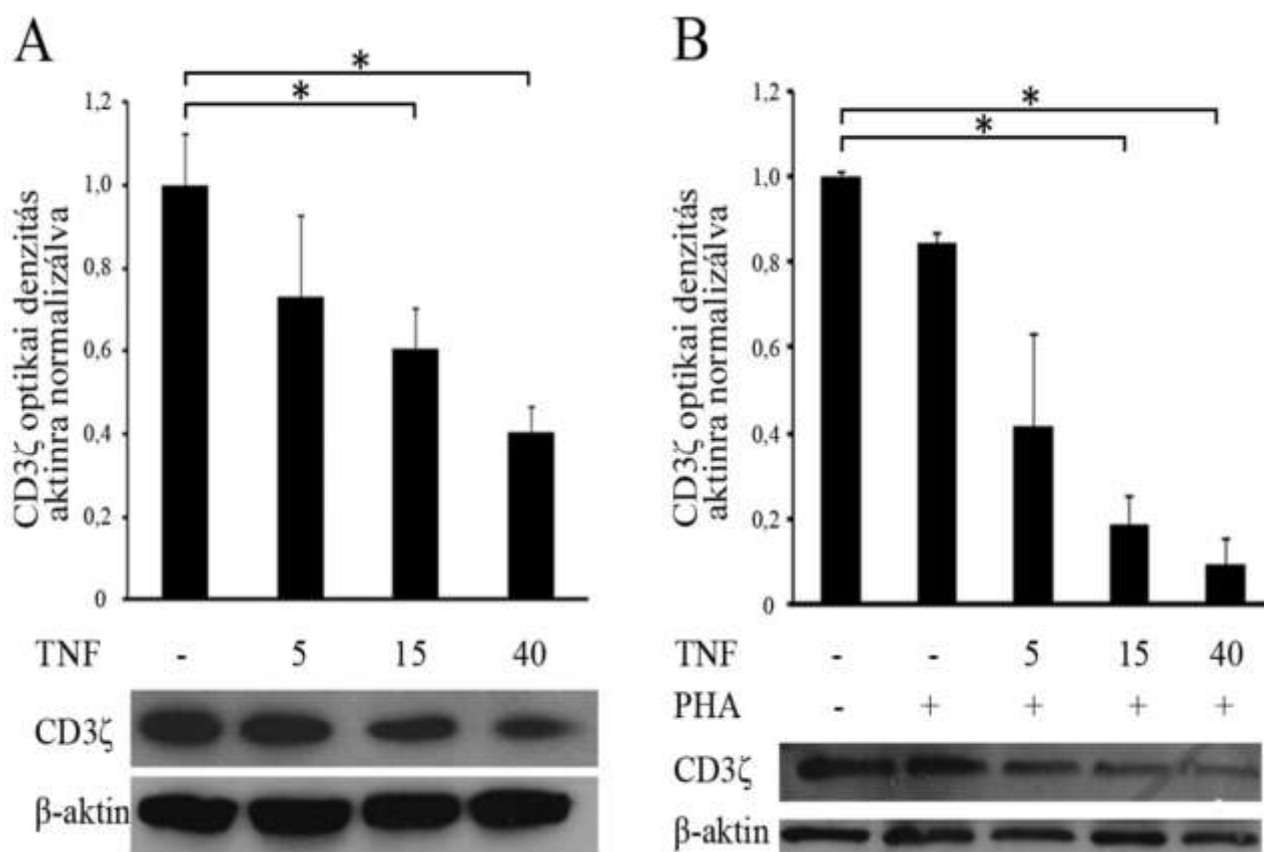
Eredményeink alapján az NO szabályozza a T-lymphocyta-aktivációt, az NO-termelés mennyisége szabja meg az NO-apoptózisra, a mitokondriumműködésre, Ca^{2+} - és ROI-szignálokra kifejtett hatásait. Az SLE-ben és RA-ban is megfigyelhető fokozott NO-termelésnek eltérő hatásai vannak a T-lymphocytákra [179, 180, 181].

6.6. A CD3- ζ -expresszió szabályozásának vizsgálata

6.6.1. A TNF- α szabályozza a CD3- ζ kifejeződését humán T-lymphocytákon

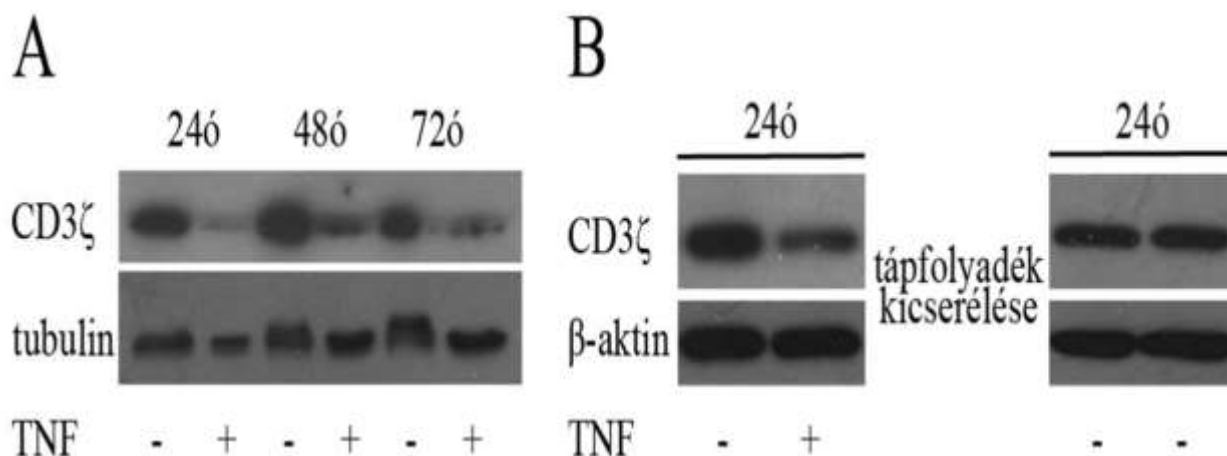
A CD3- ζ -lánc alapvető szerepet játszik a T-sejt-jelátvitelben (lásd a 3.2.4.3. fejezetet), a rendelkezésre álló ζ -lánc mennyisége szabályozza a sejt aktiválhatóságát. A proinflammatorikus hatású TNF- α fokozott termelését és a T-sejt ζ -lánc csökkent expresszióját megfigyelték SLE-ben [45] és RA-ban is [182], a ζ -lánc hiánya a TCR/CD3 komplex instabilitásával jár. A TNF- α központi szerepe jól ismert autoimmun betegségek mellett fertőző betegségekben, tumorokban, gyulladásos bélbetegségekben és sclerosis multiplexben is [183]. A krónikus TNF- α kezelés csökkenti az egér T-lymhocyták ζ -lánc-mennyiségét [184]. Tanulmányoztuk a humán TNF- α T-lymphocyta ζ -lánc kifejeződésére kifejtett hatását [124].

Western blot módszerrel vizsgálva a TNF- α dózisfüggő módon csökkenti a CD3- ζ -lánc kifejeződését humán T-sejteken (36. ábra). Jurkat-sejteken 40 ng/ml TNF- α 24 óra alatt 55 százalékkal ($p=0,018$), míg PBMC minták esetén 90 százalékkal ($p=0,034$) csökkentette a CD3- ζ -lánc-expressziót. A PBMC-hez hasonló CD3- ζ -lánc-csökkentő hatást mértünk magnetikus szeparálással tisztított CD4^+ T-sejteken is.



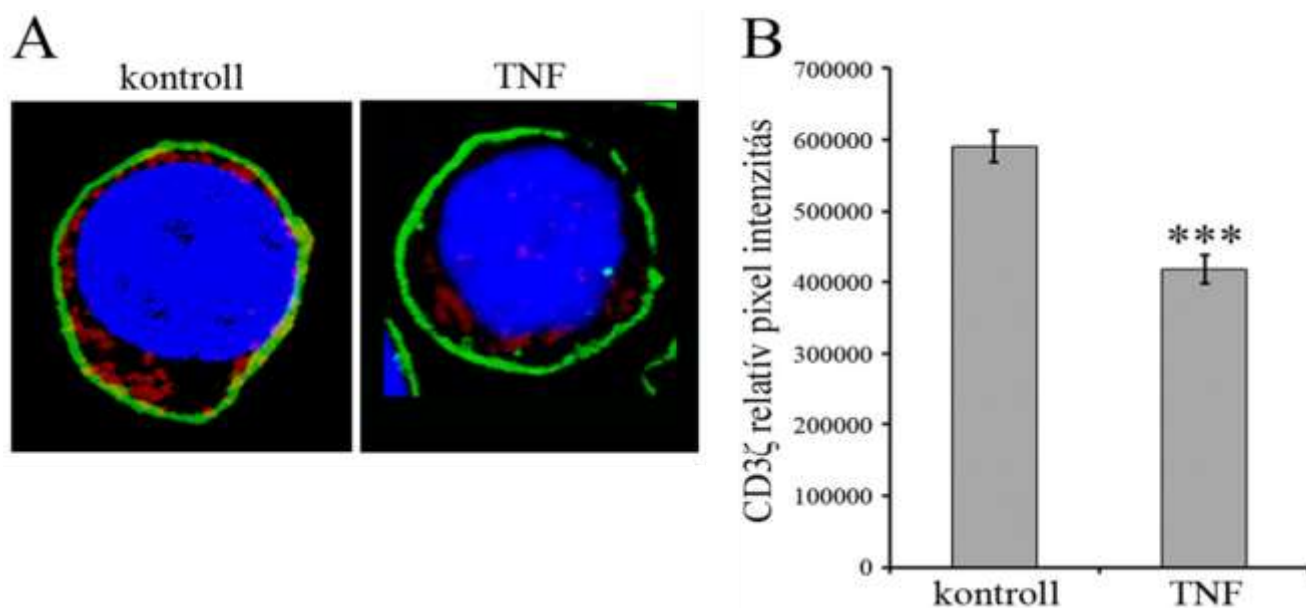
36. ábra. A 5-40 ng/ml TNF- α hatása a humán T-lymphocyták CD3- ζ -expressziójára. Az aktinra normalizált átlag \pm SEM optikaidenzitás-értékeket ábrázoltuk, (A) Jurkat-, (B) PBMC sejtek [124].

A TNF- α alkalmazását megelőzően PHA-előkezeléssel növeltük a frissen szeparált T-sejteken a TNF- α -receptor kifejeződését. A TNF- α CD3- ζ -lánc-expressziót csökkentő hatása 72 órás kezelés során változatlanul fennállt (37. ábra, A panel), tápfolyadékcserét követően a ζ -lánc-szint a kontroll értékre növekedett (37. ábra, B panel).



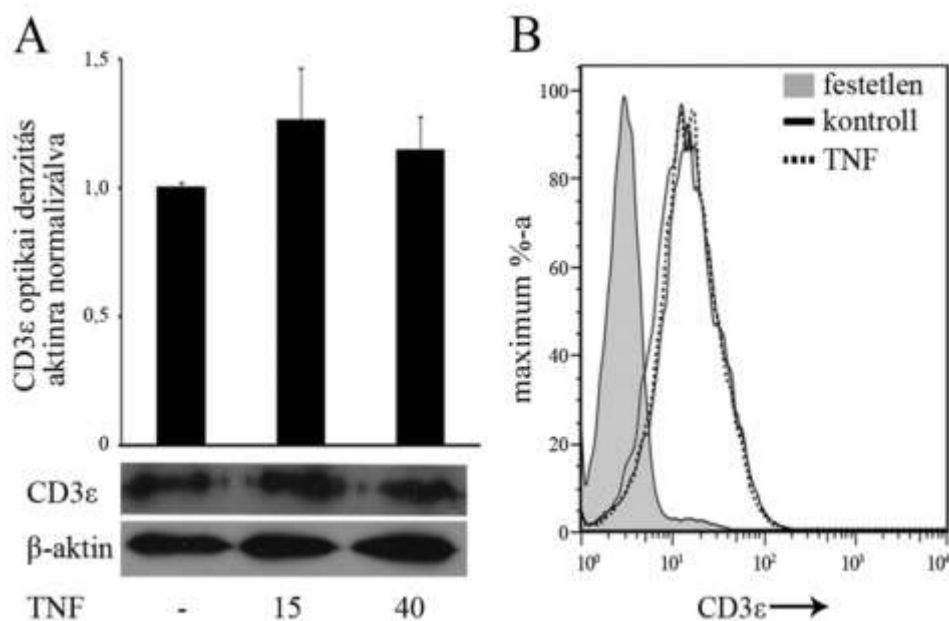
37. ábra. A TNF- α hatása a humán T-lymphocyták CD3- ζ -expressziójára. (A) Jurkat-sejtek 24-72 órás kezelése 40 ng/ml TNF- α -val; (B) Jurkat-sejtek 24 órás 40 ng/ml TNF- α kezelését követően Western blot módszerrel vizsgáltuk a CD3- ζ kifejeződését (-), vagy két alkalommal mostuk a mintákat PBS-ben, sejtenyésztőben inkubáltuk 24-órán át a sejteket, a Western blottot megelőzően (+) [124].

Konfokális mikroszkópiával (lásd az 5.6. fejezetben is) vizsgáltuk a TNF- α hatását a ζ -lánc lokalizációjára. Jurkat-sejteken 4 órán át tartó 40 ng/ml TNF- α -kezelést követően vizsgáltuk a ζ -lánc elhelyezkedését. TNF- α -kezelést követően a ζ -lánc-mennyiség csökkent, és az internalizáció fokozódott (38. ábra, A panel). 24 órán át tartó 40 ng/ml TNF- α -kezelés a ζ -lánc-mennyiség jelentős csökkenésével járt (38. ábra, B panel, $p=0,00002$).



38. ábra. A $TNF-\alpha$ hatása a humán T-lymphocyták CD3- ζ -lokalizációjára. (A) Jurkat-sejtek, konfokális mikroszkópia, a sejtmembránt CTX (zöld), a sejtmagot Dra5 (kék) festékekkel jelöltük, a CD3- ζ piros színnel látható, eredeti nagyítás: $\times 6348$. (B) 24 órás 40 ng/ml $TNF-\alpha$ -kezelés hatása a CD3- ζ kifejeződésére. A relatív pixelintenzitás-értékeket ábrázoltuk (\pm SEM), az ép sejteket definiáltuk „region of interest”-ként [124].

Ugyanakkor a $TNF-\alpha$ nem befolyásolta a CD3- ϵ -lánc kifejeződését Western blot módszerrel (39. ábra, A panel) és áramlási citometriával (39. ábra, B panel) vizsgálva.

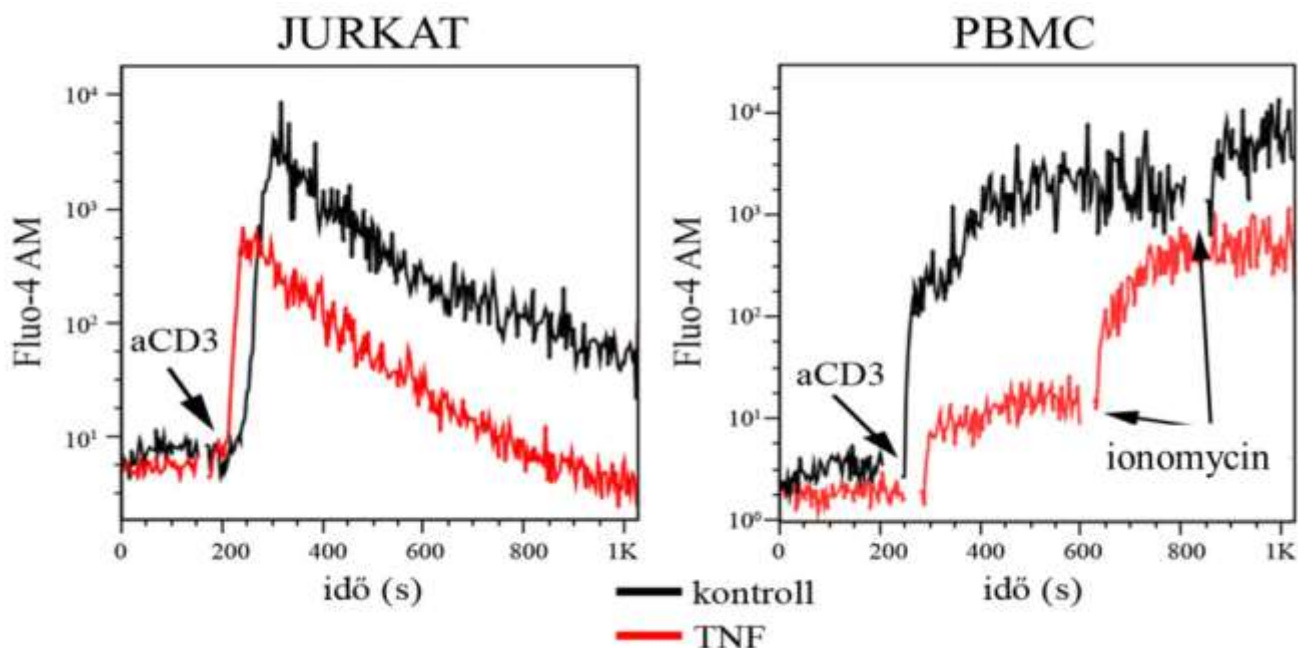


39. ábra. A $TNF-\alpha$ hatása a CD3- ϵ -lánc kifejeződésére. (A) Jurkat-sejteket 24 órán át $TNF-\alpha$ -val kezeltünk (40 ng/ml), majd Western blottal vizsgáltuk a CD3- ϵ kifejeződését. A

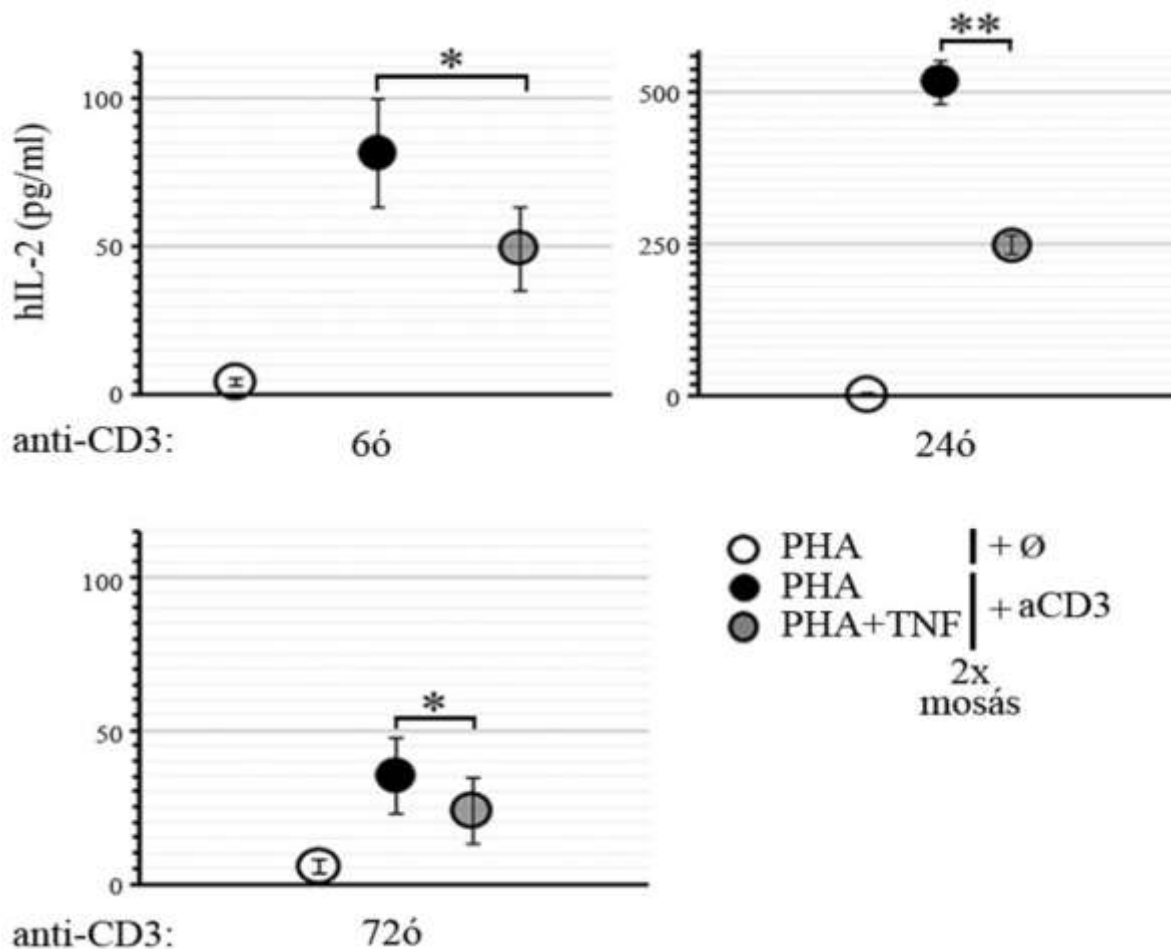
diagramon az aktinra normalizált optikaidenzitás-értékek láthatóak ($\pm SD$). **(B)** a CD3- ϵ kifejeződése áramlási citometriával vizsgálva TNF- α -kezelést követően és kontroll sejteken [124].

A TNF- α szintén nem befolyásolta a CD3- γ lánc kifejeződését. A fenti eredményeink szerint a TNF- α dóziszfüggően, reverzibilisen és szelektíven csökkenti a ζ -lánc-expressziót. Újabb kísérleti eredményeink szerint az IL-6, 8, 10, 13 és 17 is csökkenti a CD3- ζ -lánc kifejeződését, a TNF- α -hoz hasonlóan ($p < 0,05$, **nem közölt adatok**).

A ζ -lánc alapvető szerepet játszik a T-sejt-aktivációban, ezért a következő kísérletek során azt tanulmányoztuk, hogy a TNF- α -kezelés hogyan befolyásolja a Ca^{2+} -szignált és az IL-2-termelést. Eredményeink szerint a TNF- α -előkezelés csökkentette az anti-CD3-antitest-stimulációra mérhető Ca^{2+} -szignált (**40. ábra**) és a 6, 24 és 72 óra anti-CD3-antitest-aktivációra mérhető IL-2-termelést (**41. ábra**, $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,05$), így a ζ -lánc-csökkenés funkcionális következményekkel jár.

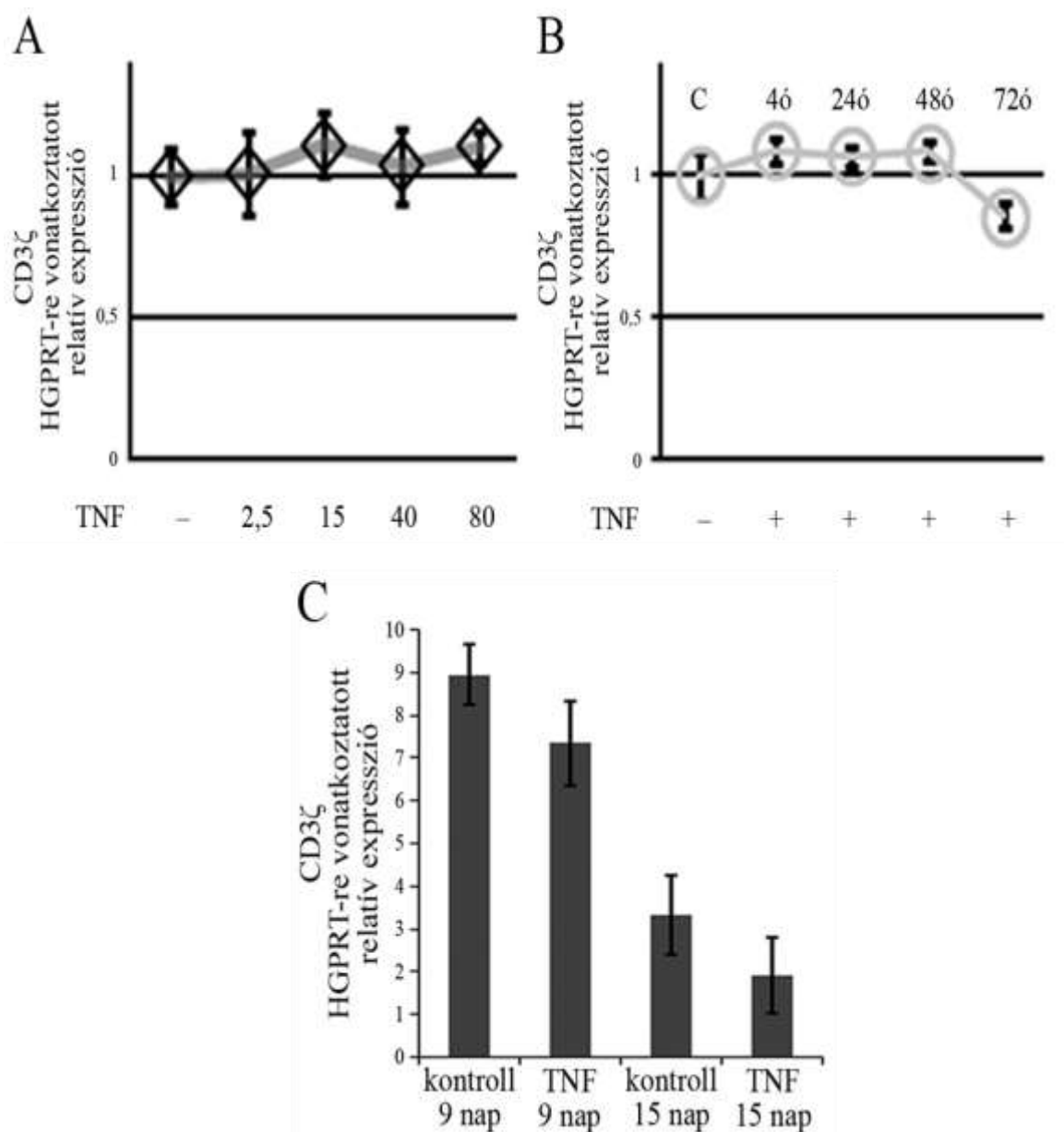


40. ábra. A TNF- α hatása a T-lymphocyta Ca^{2+} -szignálra. Jurkat- vagy perifériás mononukleáris sejteket 24 órán át kezeltük TNF- α -val (40 ng/ml). Az anti-CD3-kezelés által indukált Ca^{2+} -szignált áramlási citometriával mértük, Fluo-4 AM festék alkalmazásával, az ionomycin pozitív kontrollként szolgált [124].



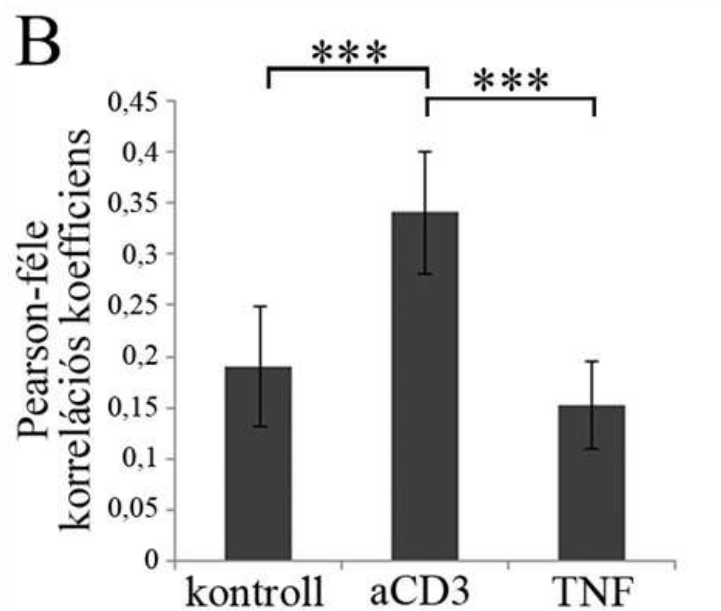
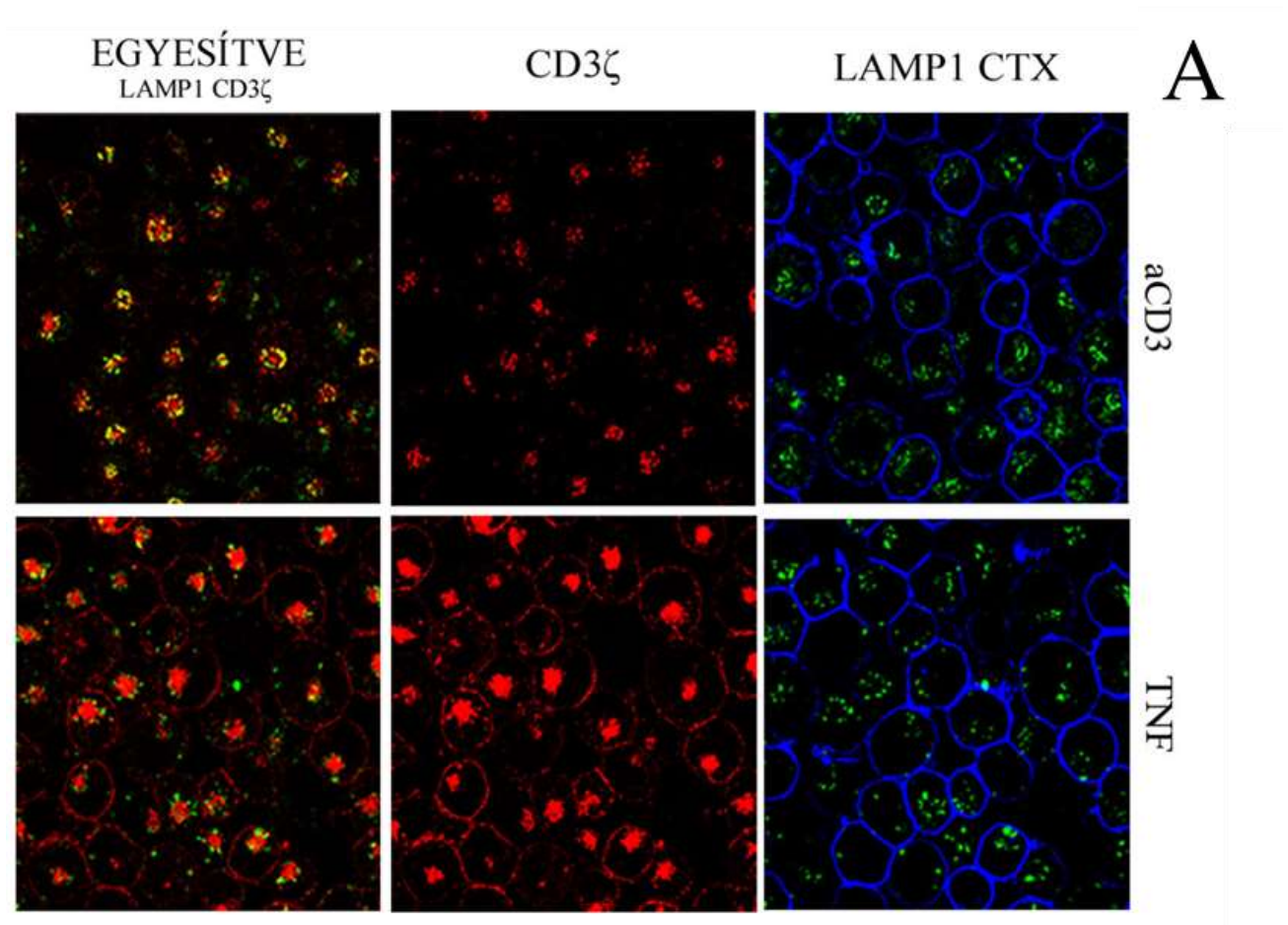
41. ábra. A $TNF-\alpha$ -kezelés hatása az $IL-2$ termelésre. Frissen izolált mononukleáris sejteket 26 órán át PHA-val ($1 \mu\text{g/ml}$) vagy 2 órán át PHA-val, majd 24 órán át PHA+ $TNF-\alpha$ -val kezeltünk. Mosást követően a minták egy része anti-CD3 ($5 \mu\text{g/ml}$) -kezelést kapott 6, 24 vagy 72 órára. Ezt követően ELISA módszerrel mértük a felülűszóban az $IL-2$ -szintet, az átlagértékeket ($\pm\text{SEM}$) ábrázoltuk (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) [124].

A további kísérleteink során tanulmányoztuk a $TNF-\alpha$ ζ -lánc-csökkentő hatásának mechanizmusát. Különböző koncentrációban és különböző időtartamig alkalmazott $TNF-\alpha$ -kezelés nem befolyásolta a CD3- ζ -lánc mRNS-szintet (42. ábra), ezek alapján feltételezhető, hogy a $TNF-\alpha$ befolyásolja a ζ -lánc lebomlását.



42. ábra. A $TNF-\alpha$ hatása a $CD3-\zeta$ mRNS-expresszióra. (A) Jurkat-sejteket különböző koncentrációjú $TNF-\alpha$ -val kezeltünk 24 óráig vagy (B és C) 40 ng/ml $TNF-\alpha$ -kezelést alkalmaztunk különböző ideig, majd RT-PCR módszerrel mértük a $CD3-\zeta$ -lánc mRNS-szintet [124].

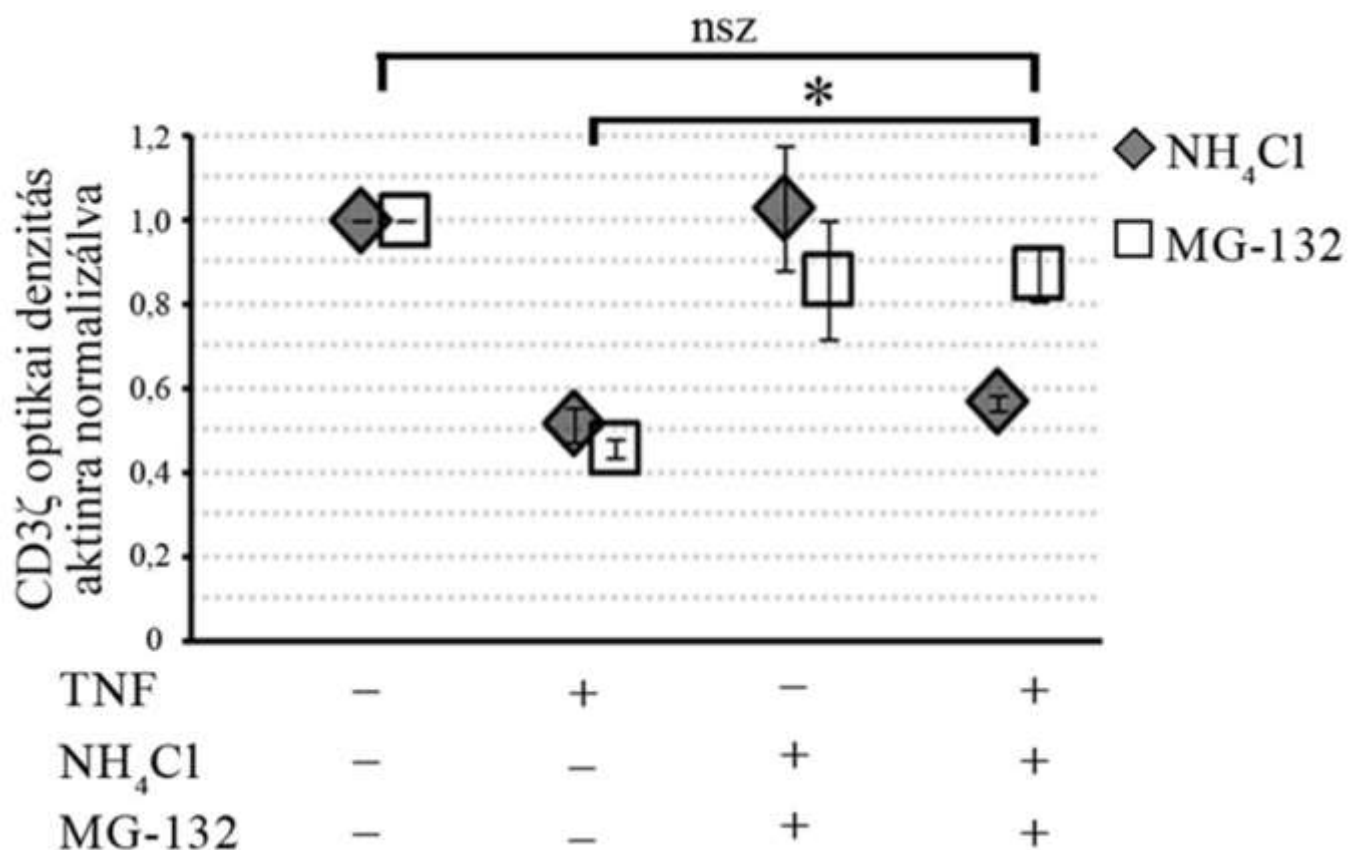
A lizoszómális degradációt a $CD3-\zeta$ -lánc és a lizoszómális LAMP-1 kolokalizáció mérése alapján tanulmányoztuk, konfokális mikroszkópia módszerével (43. ábra).



43. ábra. A CD3- ζ és a LAMP1 kolokalizáció vizsgálata. Jurkat-sejteket 4 órán át TNF- α -val (40 ng/ml) vagy anti-CD3-mal (5 μ g/ml) kezeltünk, a LAMP1 (zöld), a CTX (kék), a CD3- ζ

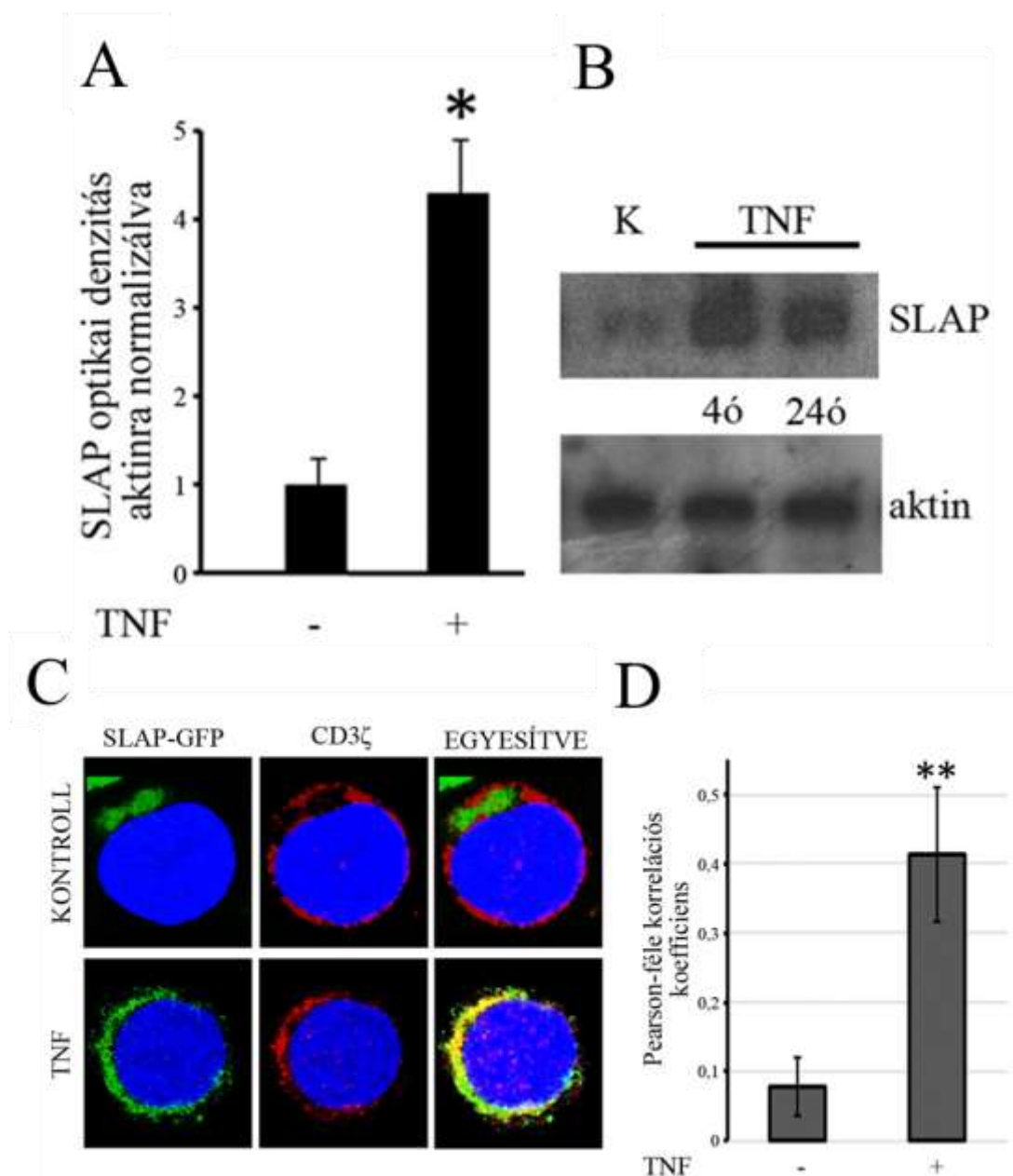
(piros), a kolokalizáció sárga színnel ábrázolódott, eredeti nagyítás: $\times 2280$. **(B)** A kolokalizáció mértéke [Pearson-féle korrelációs együttható ($***p < 0,001$)] [124].

A TNF- α -kezelés mellett nem alakult ki kolokalizáció a CD3- ζ -lánc és LAMP-1 között, míg az anti-CD3-kezelés kolokalizációval járt ($p < 0,001$). A továbbiakban a proteasómális degradációt is vizsgáltuk. A proteasómainhibitor MG-132 gátolta ($p < 0,05$), míg a lizoszómagátló NH_4Cl nem befolyásolta a TNF- α által kiváltott a CD3- ζ -lánc-csökkenést (44. ábra). Mindezek alapján a TNF- α fokozza a CD3- ζ -lánc proteasómális lebomlását.



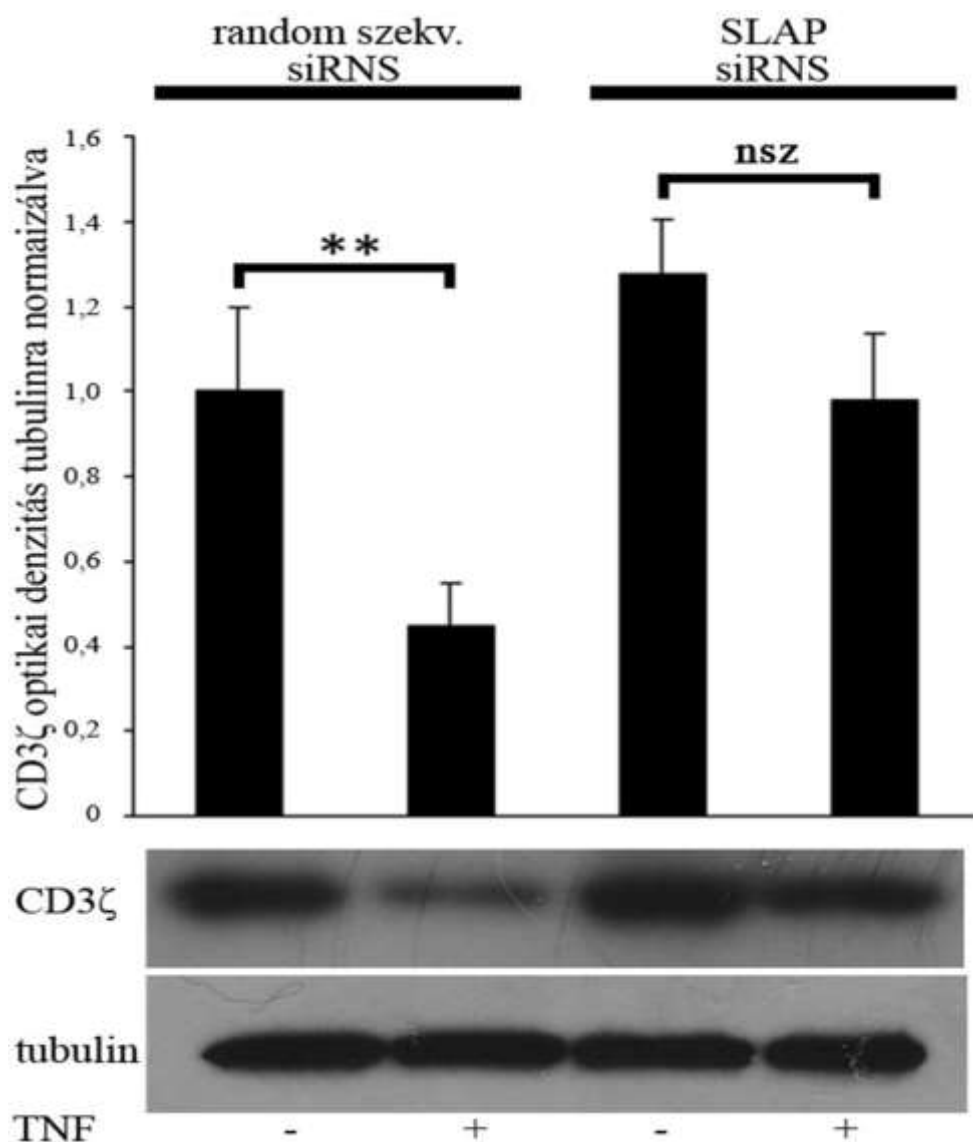
44. ábra. Lizoszómagátlás és proteasómagátlás vizsgálata a TNF- α CD3- ζ -lánc-csökkentő hatására. Jurkat-sejteket 2 órán át NH_4Cl -dal vagy MG-132-vel kezeltünk, majd 24 órán át inkubáltuk a sejteket, ezt követően Western blot módszerrel mértük a ζ -lánc-expressziót. A normalizált optikaidenzitás-értékeket ($\pm \text{SEM}$) ábrázoltuk ($*p < 0,05$) [124].

A SLAP irodalmi adatok alapján CD3- ζ -degradációt okozhat [43], így felmerült a szerepe a TNF- α által kiváltott CD3- ζ -lánc-csökkenésben is. A TNF- α -kezelés fokozza a Jurkat-sejtek SLAP-kifejeződését (45. ábra A-B, $p < 0,05$) Western blot módszerrel vizsgálva. Hasonlóan perifériás mononukleáris sejtek és magnetikus szeparálással izolált CD4 T-lymphocyták SLAP-expressziója is fokozható TNF- α -kezeléssel. Ugyanakkor a TNF- α -kezelés nem befolyásolja a SLAP mRNS mennyiségét. Konfokális mikroszkópiával igazoltuk, hogy TNF- α -kezelés hatására a SLAP és a CD3- ζ -lánc kolokalizáció mértéke fokozódik (45. ábra C-D, $p < 0,01$). A Jurkat-sejteket ezekhez a kísérletekhez eGFP-SLAP cDNS-vektorral transzfektáltuk (lásd az 5.12.3. fejezetet is), az eredményeket ImageJ software alkalmazásával értékeltük (lásd 5.6. fejezet).



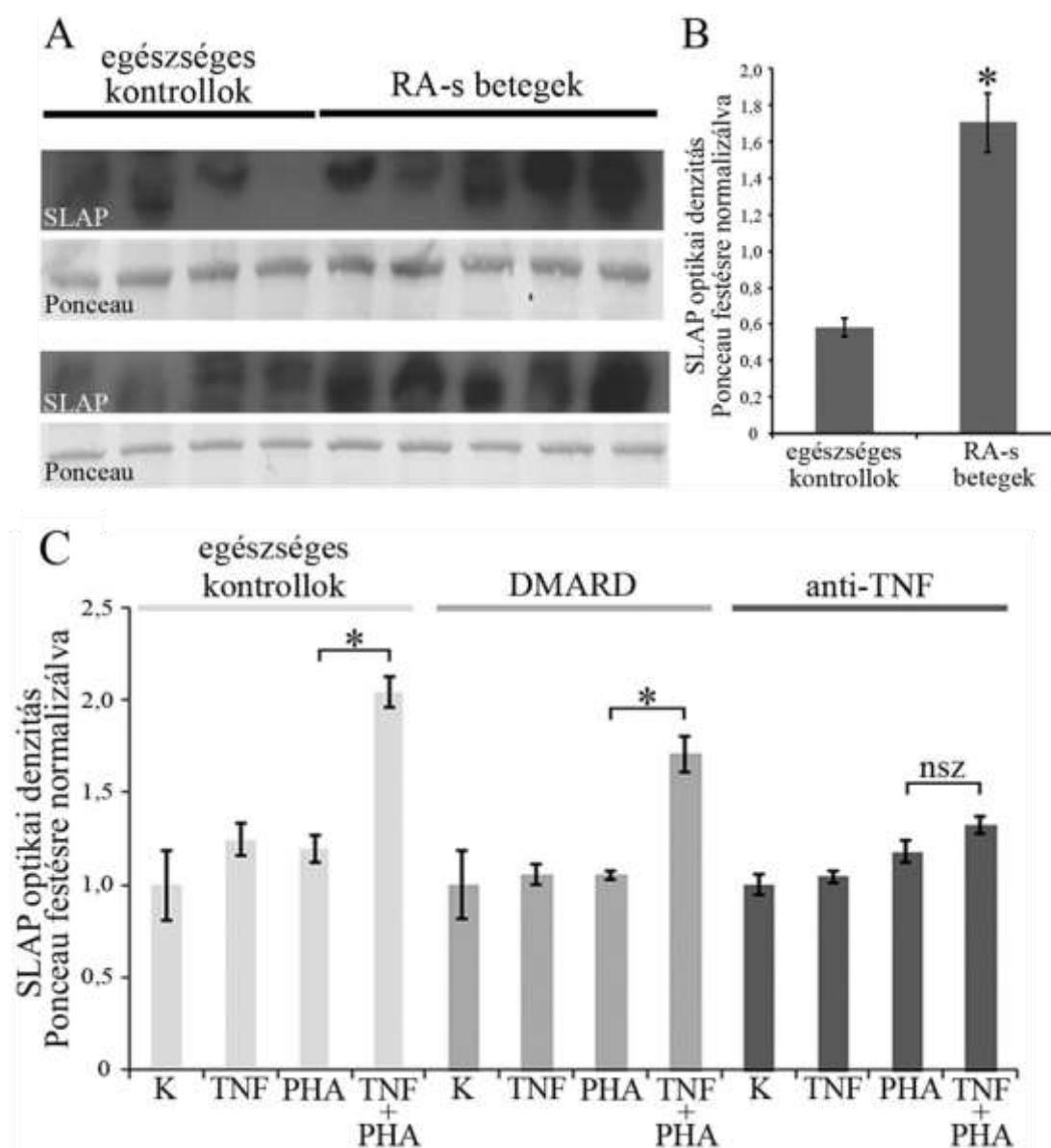
45. ábra. A $TNF-\alpha$ hatása a SLAP kifejeződésére, a CD3- ζ és a SLAP kolokalizációjának vizsgálata. **A-B** 40 ng/ml $TNF-\alpha$ (4 órás és 24 órás kezelés) hatása a Jurkat-sejtek SLAP-kifejeződésére Western blot módszerrel vizsgálva. Az aktinra normalizált optikaidenzitás-értékeket ábrázoltuk ($\pm SD$). **C-D**: konfokális mikroszkópia a CD3- ζ és a SLAP kolokalizációjának vizsgálatára. Jurkat-sejtek 4 órás 40 ng/ml $TNF-\alpha$ kezelését követően történt a mikroszkópos vizsgálat. SLAP-GFP (zöld), CD3- ζ (piros), sejtmag (kék), eredeti nagyítás: $\times 4560$. A kolokalizáció mértékét a Pearson-féle korrelációs koefficiens alapján értékeltük (** $p < 0,01$) [124].

A SLAP CD3- ζ -láncra kifejtett hatásának további vizsgálatára Jurkat-sejteket siRNS-sel transzfektáltunk. SLAP siRNS jelenlétében lényegesen csökkent a TNF- α által indukált CD3- ζ -lánc-csökkentő hatás (46. ábra), a kezeletlen sejtek CD3- ζ -kifejeződése ugyanakkor fokozódott.



46. ábra. A SLAP siRNS hatása a TNF- α által kiváltott ζ -lánc-csökkentésre. Random szekvenciájú vagy SLAP-specifikus siRNS-sel Jurkat-sejteket transzfektáltunk, ezt követően a sejteket 40 ng/ml TNF- α -val kezeltük, majd CD3- ζ Western blotot készítettünk, az ábrán az optikaidenzitás-értékek láthatóak (** $p < 0,01$, \pm SEM) [124].

Mivel az RA-s betegek T-lymphocytaiban a CD3- ζ -lánc kifejeződése csökkent [182], irodalmi adatok [43] és a saját eredményeink alapján a SLAP szabályozza a T-lymphocytákban a CD3- ζ -lánc kifejeződését, vizsgáltuk a SLAP-expressziót RA-ban (**47. ábra, A-B panel**). RA-s betegek T-sejtjeinek SLAP-expressziója 2,5-szerese volt az egészséges kontrollokénak ($p < 0,05$). Egészséges kontrollok és nem biológiai DMARD-kezelésben (disease modifying anti-rheumatic drug) részesülő RA-s betegek CD4 T-lymphocytáinak SLAP-expressziója hasonló mértékben fokozható TNF- α -kezeléssel, ugyanakkor a TNF- α -blokkoló kezelésben részesülő betegek CD4 T-lymphocytáinak TNF- α -kezelése nem növelte a SLAP kifejeződését (**47. ábra, C panel**).



47. ábra. A T-lymphocyták SLAP-expressziója fokozott RA-ban. A-B: CD4 T-sejtekben a SLAP-szintet Western blot módszerrel mértük, a kontrollként használt Ponceau-festésre normalizált optikaidenzitás-értékeket ábrázoltuk (\pm SEM) (* $p < 0,05$). **C:** PHA- és TNF- α -kezelés hatása egészséges kontrollok ($n=5$), nem biológiai betegségmódosító gyógyszerrel kezelt ($n=5$) és TNF- α -blokkoló biológiai terápiával kezelt ($n=5$, három beteg certolizumab pegolt, két beteg etanerceptet kapott) betegek T-lymphocytáinak SLAP-kifejeződésére. A CD4 T-sejteket 2 órát PHA-val kezeltük (PHA és PHA+TNF minták), majd további 24 óráig 40 ng/ml TNF- α -val kezeltük a sejteket (TNF és PHA+TNF minták). A SLAP-szintet Western blot módszerrel mértük, a kontrollként használt Ponceau-festésre normalizált optikaidenzitás-értékeket ábrázoltuk (\pm SEM) (* $p < 0,05$) [124].

6.6.2. Megbeszélés

A synovialis gyulladás helyszínén jelentősen megnő a proinflammatorikus citokinek, így a TNF- α mennyisége. Munkánk alapján a TNF- α által indukált szelektív, specifikus és reverzibilis csökkenés a ζ -lánc kifejeződésében funkcionális következményekkel is jár, csökkentti az aktivációra mérhető Ca^{2+} -szignált és az IL-2-termelést, így a csökkent ζ -lánc-kifejeződés T-lymphocyta-anergiához vezethet. A TNF- α és más proinflammatorikus és antiinflammatorikus citokinek szabályozzák a T-lymphocyták aktiválhatóságát.

A TCR/CD3 receptorkomplexen keresztül aktiválódik a T-sejt, a sejtfelszíni komplex mennyisége megszabja a sejt aktiválhatóságát. A TCR/CD3 aktiváció a komplex sejtfelszíni mennyiségét csökkenti [185]. Irodalmi adatok alapján a CD3- ζ -lánc a többi CD3-lánctól függetlenül internalizálódhat és reciklizálódhat a plazmamembránba [186, 187, 188]. A mi eredményeink szintén azt támasztják alá, hogy a ζ -lánc a többi lánctól függetlenül is szabályozódhat, hiszen a TNF- α hatása a ζ -lánc kifejeződésére szelektívnek bizonyult [124]. A CD3-láncok a komplex szintéziséhez szükségesnél lényegesen nagyobb mennyiségben szintetizálódnak és jelentős részük degradálódik, mielőtt a receptorkomplex része lehetne [189]. A ζ -lánc a többi CD3-láncnál kisebb mennyiségben szintetizálódik, így a termelődő ζ -láncok mennyisége megszabja a TCR/CD3 komplex mennyiségét. A ζ -lánc csökkenti a TCR/CD3 komplex internalizációjának mértékét, így stabilizálja a receptorkomplexet a sejtfelszínen [190].

A SLAP a T-lymphocyta-aktiváció szabályozója, számos sejtfeleségben így T- és B-lymphocytákban is kifejeződik [43]. A SLAP c-Cbl-függő mechanizmussal, a ζ -lánc ubiquitinizációján keresztül elősegíti annak lebontását [191]. A SLAP knockout egerek CD4+/CD8+ T-sejtjein a TCR-expresszió és -szignál fokozott [192]. Eredményeink alapján a TNF- α fokozza a T-sejtekben a SLAP kifejeződését, a SLAP pedig a ζ -láncot proteaszómális degradációra irányítja. A TNF- α -kezelés nem befolyásolja a SLAP mRNS mennyiségét, így a fokozott fehérjeszintézisért posttranszkripciósz szabályozás, többek között mikroRNS-ek lehetnek felelősek [193, 194]. Más munkacsoportok által publikált megfigyelésekhez hasonlóan [43] a mi kísérleti eredményeink alapján is a SLAP CD3- ζ -lánc-degradációt

okozhat. Más vizsgálokhoz hasonlóan mi is azt találtuk, hogy a CD3- ζ -lánc a lizoszómában és a proteaszómában is degradálódhat, eredményeink alapján a TNF- α elsősorban a proteaszomális degradációt fokozza, míg az anti-CD3-antitest-kezelés a CD3- ζ -lánc lizoszomális degradációjával jár.

A ZAP-70 protein spontán mutációja (SKG modell) megváltoztatva a thymusban zajló T-sejt-szelekciós folyamatokat, a humán RA-hoz hasonló progresszív szimmetrikus polyarthritishez vezet [195]. A zymozanindukálta arthritis lényegesen enyhébb formában zajlik le a SLAP knockout SKG egérben, mint a kontroll SKG egérben [196]. A SLAP-hiányos állatban a szabályozó T-lymphocyták fokozott száma és a Th17-sejtek csökkent száma hozzájárulhat a lényegesen enyhébb lefolyású arthritishez.

Kísérleteink eredménye szerint a TNF- α -blokkoló biológiai terápiával kezelt betegek CD4 T-lymphocytáiban a TNF- α -kezelés nem fokozta a SLAP kifejeződését, szemben a nem biológiai betegségmódosító szerrel kezelt betegekkel és az egészséges kontrollokkal. Ezt magyarázhatja az, hogy a biológiai terápiás készítmények (etanercept és certolizumab pegol) a sejtfelszíni TNF- α -hoz kötődve meggátolták a további TNF- α -kötődést/jelátvitelt. A biológiai terápiás gyógyszerek sejtfelszíni jelenlétét nem vizsgáltuk.

A SLAP tehát szerepet játszik a T-sejt-aktiváció szabályozásában a CD3- ζ -lánc proteaszomális degradációjának fokozásával. A citokinkörnyezet így a CD3- ζ -lánc-expresszió keresztül jelentősen befolyásolhatja a T-lymphocyta aktiválhatóságát. A CD3- ζ -lánc SLAP által indukált csökkent kifejeződésének szerepe lehet a T-lymphocyta ζ -lánc SLE-ben és RA-ban leírt csökkent expressziójában [45, 182].

6.7. Glikozidázok szerepének vizsgálata RA-ban

6.7.1. Glikozidázok kifejeződése synovialis mintákban

A poszttranszlációs proteinmódosulások közül a citrullináció a legtöbbet tanulmányozott RA-ban [16, 17]. A leggyakoribb poszttranszlációs módosulás a glikoziláció, ugyanakkor a szerepe ma még kevésbé tisztázott arthritisekben. Korábbi publikációk alapján a glikozidázok

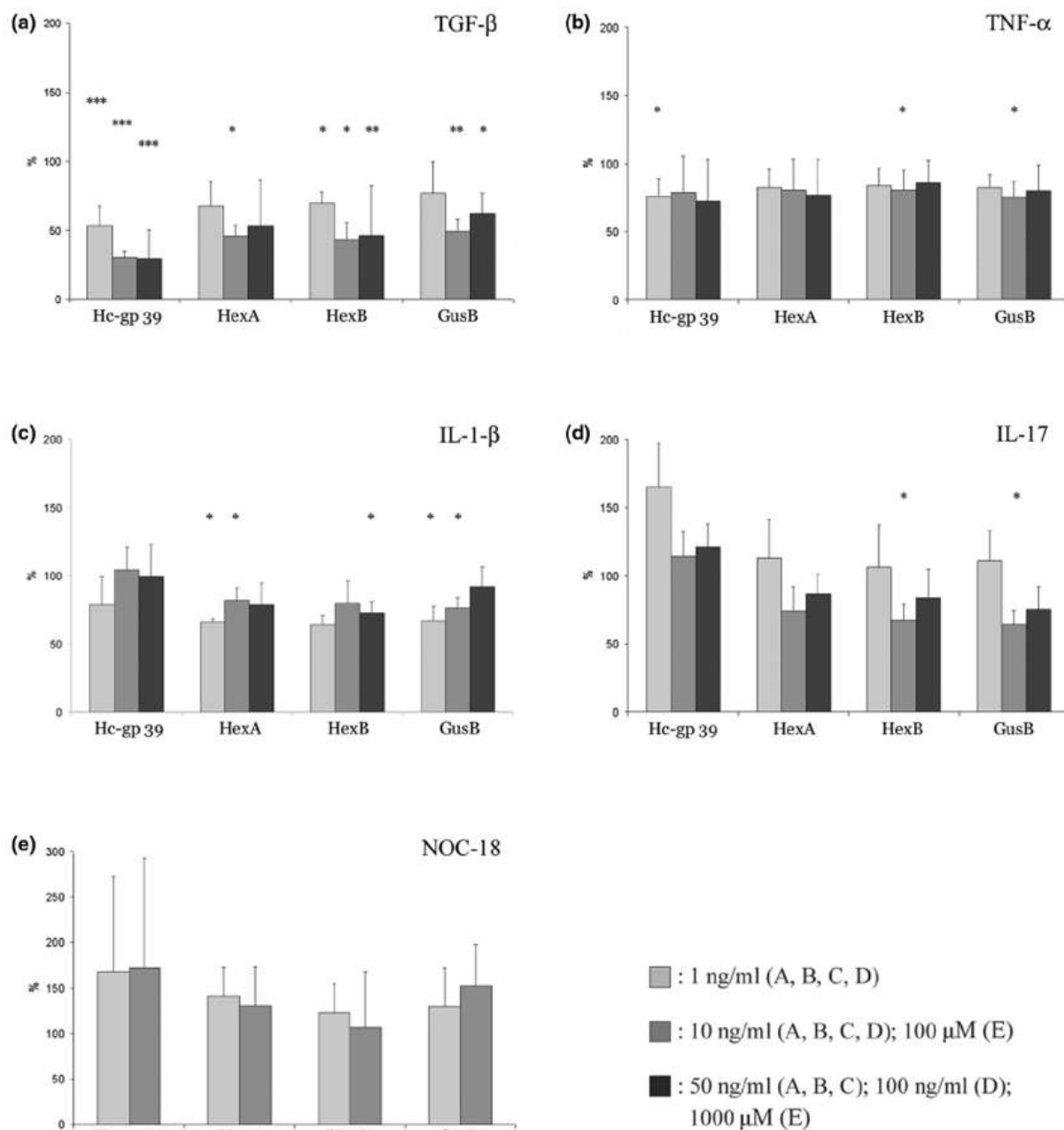
szintje magasabb RA-ban, mint arthrosisban [197, 198, 199]. Munkacsoportunk korábbi eredményeinek értelmében a mátrix metalloproteinázokhoz hasonlóan a glikozidázok szerepe is meghatározó lehet az RA-ban megfigyelhető porcdegradációban [200]. Irodalmi adatok alapján a 2-es típusú kollagénre specifikus antitestek arthritogenitása glikozidázkezeléssel gátolható [201]. A Hc-gp 39 a glikozidázokhoz hasonló protein, a kitinázszerű fehérjék 18 csoportjába tartozik, enzimatis aktivitással nem rendelkezik [151, 202].

Mindezek alapján tanulmányoztuk a glikozidázok (GusB: β -D-glucuronidase/ β -D-glükuronidáz; HexA: hexózinidáz A alegység és HexB: hexózinidáz B alegység) és a Hc-gp-39 kifejeződését arthritisben [128]. RA-s és arthrosisos betegek térdízületi synovialis mintáiból fibroblastokat nyertünk az 5.2.2. fejezetben leírtaknak megfelelően, és mértük RT-PCR módszerrel a glikozidázok és a Hc-GP-39 expresszióját. Eredményeink szerint a Hc-gp-39 fejeződött ki a legnagyobb mennyiségben synovialis fibroblastokban. Más vizsgálókhoz hasonlóan [203] a mi eredményeink szerint is a HexA és a HexB jelentős mennyiségben expresszálódik a synovialis gyulladás helyszínén RA-ban.

A GusB-enzimaktivitás az RA-s synovialis folyadékban magasabb volt az arthrosisos mintákon mért értékeknél, ugyanakkor a synovialis membránban és a fibroblastokban nem találtunk különbséget a két vizsgált betegcsoport között. Enzimhisztokémiai módszerrel vizsgálva (lásd 5.13.1. fejezet) synovialis fibroblastokban a GusB-enzim a lysosomákban helyezkedik el. Arthrosisos betegek fibroblastjaiban a GusB-szubsztrát nagyobb intenzitású fluoreszcens jelet adott, mint az RA-s betegek esetében.

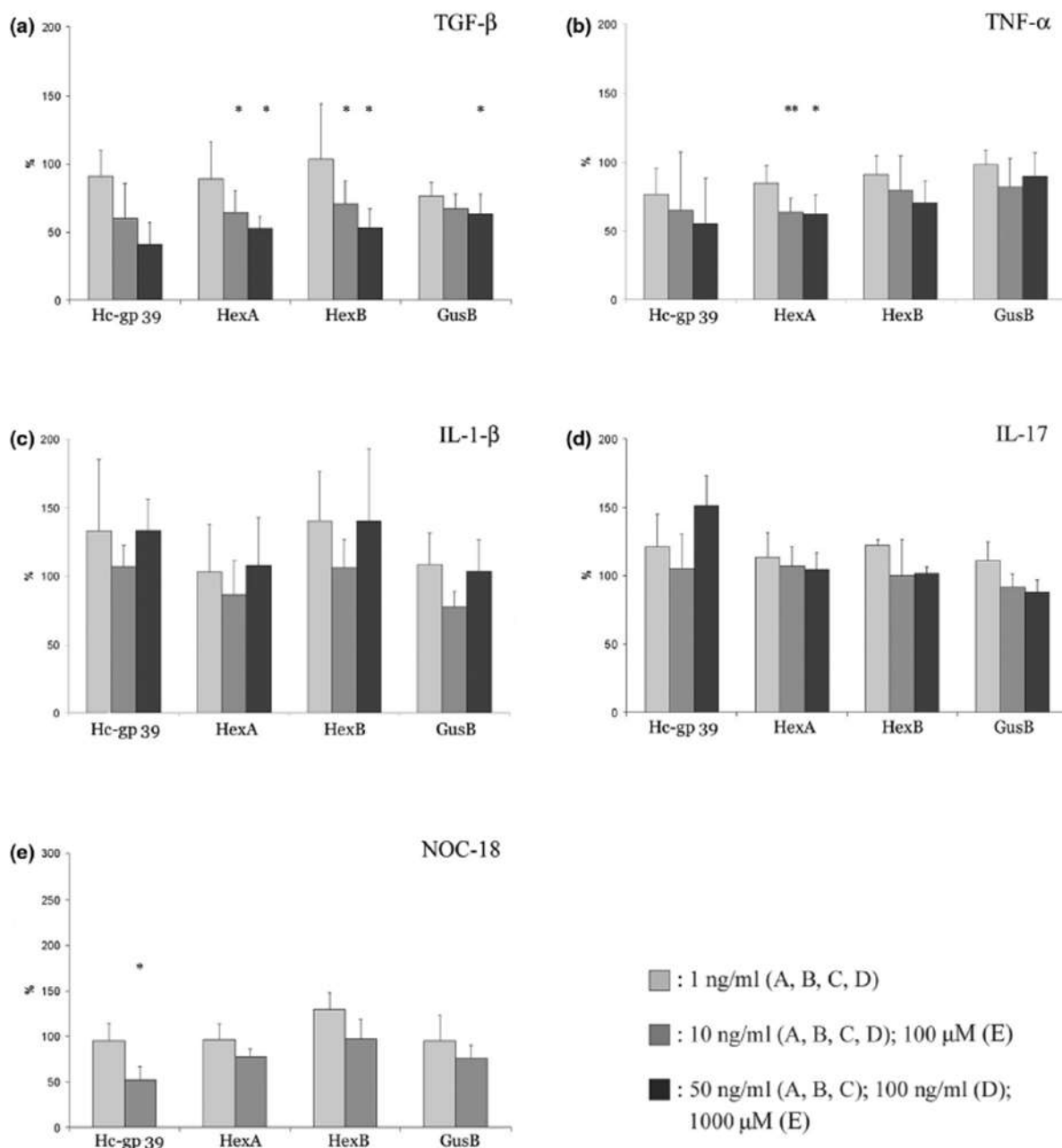
A TGF β gátolta a Hc-gp 39, HexA, HexB és GusB mRNS kifejeződését fibroblastokon RT-PCR módszerrel mérve, a gátlás mértéke nagyobb volt az RA-s betegek mintáin, mint az arthrosisos betegek esetében (48-49. ábra). A legnagyobb mértékű gátlást a Hc-gp 39 gén kifejeződésében mértünk RA-s mintákon. A TNF- α gátolta a HCgp-39, HexB, GusB; az IL-1- β gátolta a HexA, HexB, GusB; az IL-17 gátolta a HexB és a GusB kifejeződését, míg a NOC-18 nem befolyásolta a glikozidázok mRNS-szintjét RA-s betegek fibroblastjain. Arthrosisos betegek mintáin az RA-ban szenvedő betegek mintáihoz képest a proinflammatorikus TNF- α , IL-1 β és IL-17 kisebb mértékben gátolta a glikozidázexpressziót. Kontrollként RA-s betegekből származó fibroblastokon vizsgáltuk a proinflammatorikus citokinek hatását a mátrix metalloproteináz-3 kifejeződésére, ami négyszeres értéket meghaladó volt RT-PCR módszerrel mérve. Arthrosisos betegek synovialis fibroblast eredetű

mikrovesiculáiban (lásd 6.8.3 fejezet) nagyobb mennyiségű GusB-enzim-aktivitást mértünk, mint az RA-s betegek mintáiban.



48. ábra. RA-s betegekből izolált fibroblastok glikozidázexpressziója. RA-s betegek térdízületéből izolált fibroblastok Hc-gp 39-, HexA-, HexB- és GusB-expresszióját vizsgáltuk. A sejteket 24 órán keresztül stimuláltuk citokin vagy NO donor NOC-18-kezeléssel, ezt követően mértük RT-PCR módszerrel a glikozidázok génexpresszióját (HGPRT-hez

viszonyítva). A kezeletlen mintán mért génexpressziót tekintettük 100%-nak. A: $TGF-\beta 1$; B: $TNF-\alpha$; C: $IL-1\beta$; D: $IL-17$ -stimuláció, E: NOC-18-kezelés. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0015$ [128].



49. ábra. Arthrosisos betegekből izolált fibroblastok glikozidázexpressziója.

Arthrosisos betegek térdízületéből izolált fibroblastok Hc-gp 39-, HexA-, HexB- és GusB-expresszióját vizsgáltuk. A sejteket 24 órán keresztül stimuláltuk citokin-, vagy NO-donor NOC-18-kezeléssel, ezt követően mértük RT-PCR módszerrel a glikozidázok génexpresszióját

(HGPRT-hez viszonyítva). A kezeletlen mintán mért génexpressziót tekintettük 100%-nak. A: TGF- β 1; B: TNF- α ; C: IL-1 β ; D: IL-17-stimuláció, E: NOC-18-kezelés. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, [128]

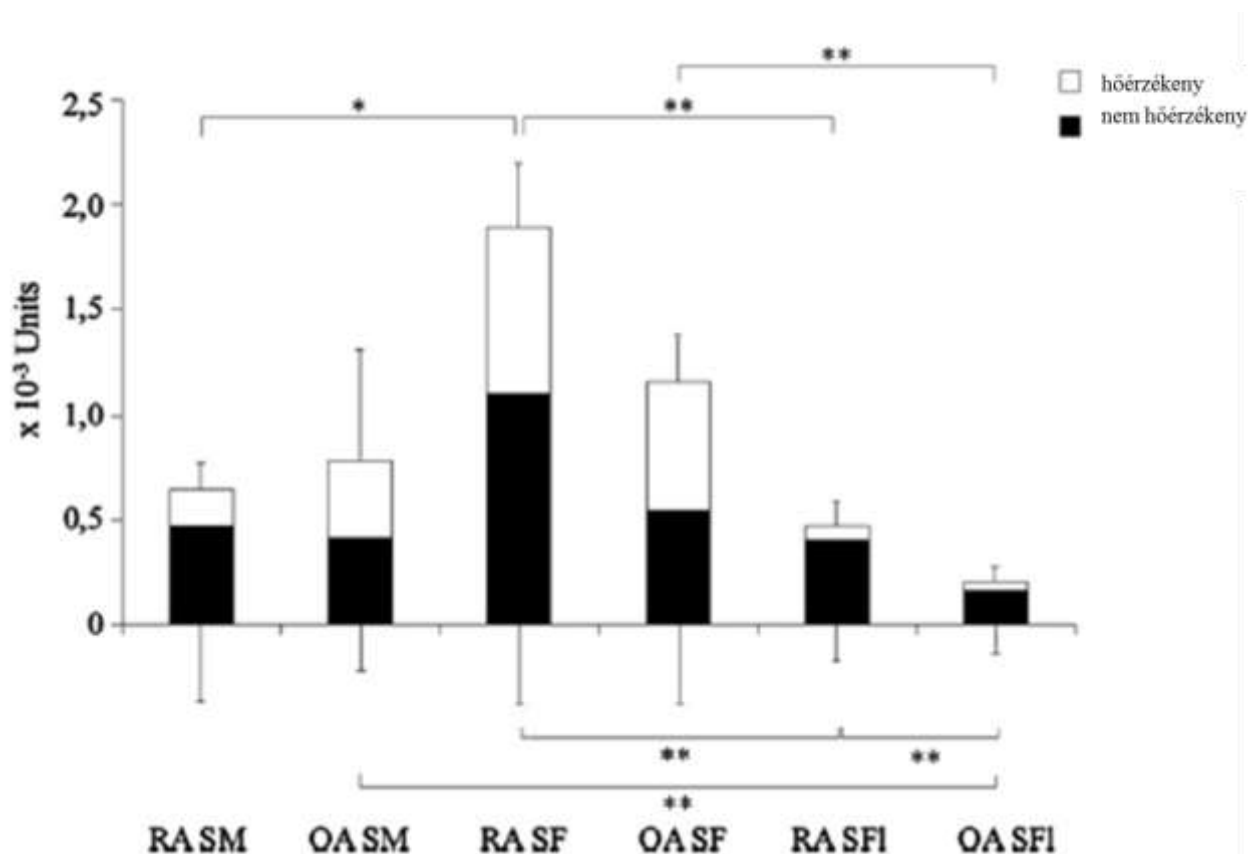
6.7.2. Hexozaminidáz D vizsgálata

Korábbi eredményeink és irodalmi adatok alapján a glikozidázoknak szerepe lehet az RA-ban zajló porcdegradációban. 2009-ben egy új hexozaminidáz enzimet írtak le, amely a HEXDC gén terméke és a hexozaminidáz D (HexD) nevet kapta [204]. A HexD enzim a HexA és HexB enzimmel ellentétben nukleocitoplazmatikus elhelyezkedésű és nem hőérzékeny. Vizsgáltuk a HexD enzim expresszióját synovialis mintákon [129].

A vizsgált RA-s és arthrosisos betegek synovialisfibroblast- és synovialismembrán-mintáiban az N-acetil-galaktózinidáz enzim aktivitásáért mintegy 50 százalékban; ugyanakkor a synovialisfolyadék-mintákban 80-90 százalékban a HexD enzim volt felelős (nem hőérzékeny frakció, **50. ábra**). Az RA-s és az arthrosisos betegekből származó synovialis fibroblastokban egyaránt nagyobb volt a hőérzékeny galaktozidáz enzim aktivitása, mint a synovialis folyadékban ($p < 0,01$; $p < 0,01$). RA-s betegek fibroblastjai nagyobb hőérzékeny galaktozidázaktivitást mutattak, mint a synovialismembrán-minták ($p < 0,05$). Továbbá RA-s betegek synovialis folyadékában a nem hőérzékeny frakció (HexD) aktivitása nagyobb volt, mint az arthrosisos betegek mintái esetén mért értékek ($p < 0,01$).

RT-PCR módszerrel mérve az RA-s és arthrosisos betegek synovialismembrán- és synovialisfibroblast-mintáinak HEXDC-expressziójában nem találtunk érdemleges különbséget. A továbbiakban vizsgáltuk a TGF- β 1; TNF- α ; IL-1 β ; IL-17 és NO-donor NOC-18 hatását a HEXDC mRNS expresszióra. A TGF- β 1 (10 és 50ng/ml) csökkentette, míg TNF- α ; IL-1 β ; IL-17 és NOC-18 nem befolyásolta az RA-s és arthrosisos betegekből származó fibroblastokban a HEXDC mRNS-szintet.

Jelentős HexD-aktivitást mértünk az RA-s és az arthrosisos betegek synovialisfibroblast-eredetű microvesiculáiban (lásd **6.8.3 fejezet**). RA-s és arthrosisos betegek synovialis folyadékából izolált extracellulárisvesicula-frakcióban szintén HexD-aktivitást mértünk.



50. ábra. Galaktózaminidáz-aktivitás mérése synovialis mintákon. A hőérzékeny és a nem hőérzékeny frakciók enzimaktivitásának mérése RA-s és arthrosisos betegek synovialismembrán- és synovialisfibroblast-mintáin. SF:synovialis fibroblast; SFL: synovialis folyadék; SM synovialis membrán. A nem hőérzékeny frakció a HexD-enzim aktivitásának felel meg (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) [129].

6.7.3. Megbeszélés

A synovialis fibroblastok jelentős mennyiségű citokint, kemokint és mátrix metalloproteinázokat termelnek, alapvető szerepük van a hyalinporc destrukciójában és potenciális terápiás célpontot képeznek RA-ban [16, 17, 205, 206, 207]. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a mátrix metalloproteinázok mellett a glikozidázok is

megtalálhatóak a synovialis gyulladás helyszínén, és szerepük lehet a krónikus gyulladás során kialakuló porckárosodásban [200]. Az RA-s betegek synovialis folyadékában az N-acetil-glükózaminidáz- (NAG) és a GusB-aktivitás magasabb volt, mint arthrosisos betegek esetében, ugyanakkor az α -D-mannozidáz és a β -D-galaktozidáz enzim aktivitása egyaránt alacsony volt az RA-s és az arthrosisos betegek synovialis folyadékában. A NAG és a GusB együtt és külön-külön is hatékonyan bontották a hyalinporcot [200].

Elsőként vizsgáltuk a közelmúltban leírt HexD enzimet humán betegségben [129]. Jelentős mennyiségben található eredményeink alapján a HexD enzim RA-s és arthrosisos betegek fibroblastjaiban, kisebb mértékben a synovialis membránban. A synovialis mintákban mérhető galaktózaminidáz-aktivitásért jelentős mértékben a nem hőérzékeny HexD enzim a felelős.

Érdekes módon arthrosisban és RA-ban az általunk vizsgált citokinek gátolják vagy jelentősen nem befolyásolják a synovialis fibroblastok glikozidáztermelését. Eredményeink alapján a glikozidázok szerepe feltehetően önmagában nem meghatározó RA-ban és OA-ban, de más, a porcdegradációban szerepet játszó enzimekkel együtt hozzájárulhatnak az ízületi porc károsodásához mindkét betegségben. A glikozidázok igen szorosan szabályozott expressziója az ízületi porc homeosztázisában betöltött központi szerepükre utal [128, 129].

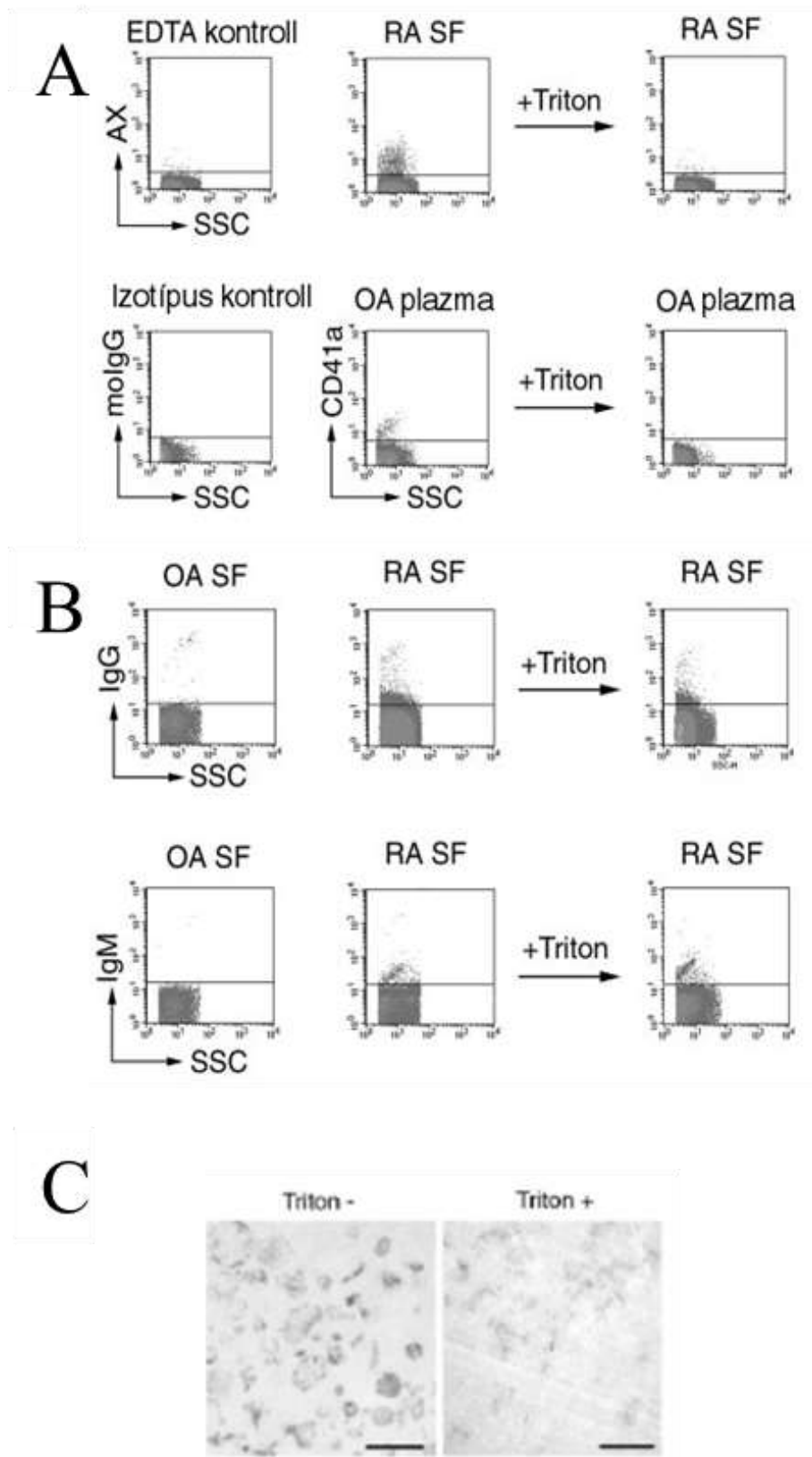
6.8. Extracelluláris vesiculák karakterizálása és vizsgálata

6.8.1. Preanalitikai tényezők szerepe az extracelluláris vesiculák mérésében

Az utóbbi évek egyik legizgalmasabb kutatási területe az extracelluláris vesiculák (EV) vizsgálata. Az EV-k membránnal határolt, a sejteknél nagyságrenddel kisebb méretű struktúrák [208], alapvető szerepet játszanak a sejtek közötti kommunikációban. Az MV-k 100-1000 nm-es EV-k (lásd a 3.2.4.6. fejezetet is), vizsgálatukat nehezíti, hogy méretük hasonló az immunkomplexek méretéhez, ezért tanulmányoztuk elkülönítésük módját az immunkomplexektől és vizsgáltuk az MVk pontos méretét [134].

TEM és AFM módszerekkel (lásd az 5.7.1. és az 5.7.2. fejezeteket is) vizsgálva az EV-k változatos nagyságú, membránnal határolt struktúrák. A DLS (lásd az 5.16.1. fejezetet is) az EV-k méretének vizsgálatára alkalmas módszer, egészséges egyének plazmájában 176 ± 20 nm, RA-s betegek synovialis folyadékában 176 ± 30 nm volt az MV-k átmérője DLS módszerrel mérve. AFM és DLS módszerrel mérve az oldhatatlan immunkomplexek mérete hasonló volt az MV-k méteréhez.

Áramlási citometriával vizsgáltuk az EV-ket és az immunkomplex/protein aggregátumokat. Eredményeink szerint 0,05% Triton X-100 alkalmazása mellett az annexinpozitív és a CD41-pozitív események száma jelentősen csökkent synovialis folyadékban és plazmában mérve (51. ábra, A panel). Az IgG- és IgM-jelöléssel ábrázolódó struktúrák mennyisége nem változott jelentősen 0,05% Triton X-100 hatására (51. ábra, B panel). Az annexin és a CD-41 az általunk alkalmazott módszerrel (lásd az 5.5.5. fejezetet is) az EV-ket, míg az IgG és az IgM főként az immunkomplexeket jelöli. Az alkalmazott Triton X-100 lizálja a mikrovészikulákat, de nem befolyásolja az immunkomplex-eredetű jeleket. A TEM-felvételen szintén jól látható (51. ábra, C panel), hogy a Triton-kezelést követően eltűnnek az MV-k, csupán membránfrangmentumok ábrázolódtak. Immunglobulint és annexint is tartalmazó struktúrák igen kis arányban fordultak elő. Az IgG- és IgM-tartalmú immunkomplexek száma nagyobb volt RA-s betegek synovialis folyadékában, mint az arthrosisos betegekében ($p < 0,001$; $p < 0,001$). Az immunkomplexek C3-komplement faktor ELISA módszerrel mért értéke jó korrelációt mutatott az áramlási citometriával mért IgM-immunkomplex-szinttel. RA-s betegek synovialis folyadékában az MV-kapuban mérhető összes eseményszám (EV + immunkomplexek) nem korrelált a detergens kezelés után mérhető események számával (EVk), de jól korrelált az immunkomplexek mennyiségével. Ez a megfigyelésünk is igazolja, hogy a magas immunkomplexszám jelentős részét képezi az áramlási citometriával az EV-kapuban mérhető összes eseményszámnak RA-s betegek synovialis mintáin.



51. ábra. EV-k és immunkomplexek detergensérzékenységének vizsgálata. A: RA-s betegek synovialis folyadék (annexinjelölés) és arthrosisos beteg plazmamintáinak (CD41-djelölés) vizsgálata 0,05% Triton-kezelést megelőzően és azt követően. **B:** RA-s betegek

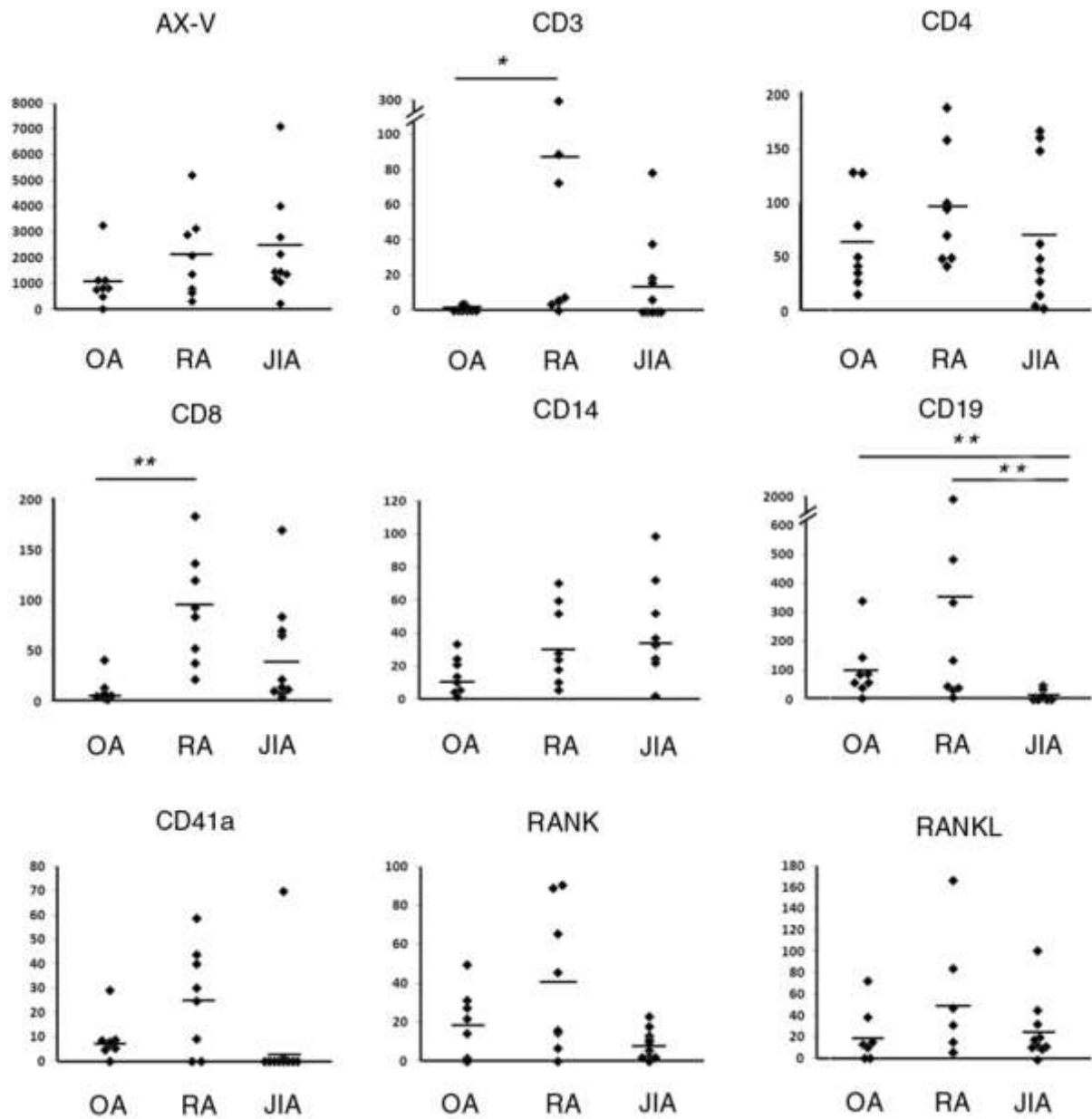
synovialis mintáinak IgG- és IgM-jelölés-vizsgálata 0,05% Triton-kezelés előtt és után (molG: izotípuskontroll). C: TEM 0,05% Triton alkalmazása előtt és után [134].

6.8.2. Extracelluláris vesiculák rheumatoid arthritisben

A detergens lízis alkalmazásával eredményeink alapján meghatározható a biológiai minták (plazma, synovialis folyadék) MV-koncentrációja. A további kísérleteink során vizsgáltuk az arthrosis, RA-s és JIA-s betegek synovialis folyadékában megtalálható MV-ket [135]. A JIA változatos klinikai képpel járó, krónikus gyermekkori ízületi gyulladás, az általunk vizsgált minták oligoarticularis érintettségű betegektől származtak.

NTA módszerrel (lásd az 5.16.2. fejezetet is) vizsgálva az MV-k mérete 150-200 nm volt, hasonlóan a más módszerrel mért korábbi eredményeinkhez [134]. Az MV-k összetételét a 20500 g pelletekben (lásd az 5.15.1. fejezetet is) tömegspektrometriával vizsgáltuk (lásd az 5.8. fejezetet is). Az arthrosis, RA-s és JIA-s mintákban 105, 98 és 88 fehérjét azonosítottunk. Minden vizsgált mintában megtalálható volt többek között aktin, myosin, tubulin, HLA-antigének és Na/K ATP-áz. Szintén azonosítottunk plazmaproteineket, így fibrinogént, transzferrint, albumint, komplementproteineket és immunglobulinokat is a pelletekben. Érdekes módon nem találtunk érdemleges különbséget a vizsgált proteinek mennyiségében a betegcsoportok között.

Áramlási citometriával vizsgálva a $CD3^+$ MV-k száma nagyobb volt az RA-s mint az arthrosis mintákban (52. ábra, $p < 0,05$). Érdekes módon az RA-s betegek synovialis mintáiban lényegesen több $CD8^+$ MV-t mértünk, mint az arthrosis betegek esetében, ugyanakkor a $CD4^+$ MV-k számában nem találtunk különbséget a vizsgált betegcsoportok között. RA-ban és arthrosisban nagyobb volt a $CD19^+$ MV-k száma, mint JIA-ban. Nem találtunk szignifikáns különbséget az annexin, $CD14^+$, $CD41a^+$, $RANK^+$ és $RANKL^+$ MV-k számában a vizsgált betegcsoportok között. Arthrosis és RA-s betegek plazmamintáiban a mérési küszöb alatt volt a $CD3^+$ és $CD8^+$ MV-k száma, ami arra utal, hogy az MV-k elsősorban a synovialis gyulladás helyszínén termelődnek. Az RF szintje szoros korrelációt mutatott a T- és a B-lymphocytá-eredetű MV-k számával ($p = 0,002$; $p = 0,001$).



52. ábra. Arthrosisos, RA-s és JIA-s betegek ízületi folyadékában megtalálható mikrovesiculák vizsgálata, differenciál detergens lízis alkalmazásával. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ [135].

6.8.3. Megbeszélés

Az EVk részleteiben ma még nem ismert fiziológiás funkcióikon kívül hozzájárulhatnak tumorok [209], hematológiai betegségek [210], cardiovascularis betegségek [211] és szisztémás autoimmun kórképek [64, 212, 213, 214] patogeneziséhez is. Több vizsgáló is törekedett az EV-k mérésének standardizálására [215, 216], ennek ellenére még ma is számottevő különbségek vannak az EV-k kutatásával foglalkozó munkacsoportok között a standard módszerek kivitelezésében, számos módszertani kérdés vár még megoldásra. Vizsgálataink alapján a TEM, AFM és DLS módszerek közül az EV-k méretének meghatározására a DLS a leginkább alkalmas módszer. Más vizsgálókhoz hasonlóan [217, 218] eredményeink szerint az MV-k átmérője körülbelül 176 nm. Az MV-k méteréhez hasonló az oldhatatlan immunkomplexek mérete kísérleteink alapján és korábbi publikációk alapján egyaránt [219, 220], elkülönítésük alapvetően fontos az EV-k és a vesiculák pontos méréséhez. Az immunkomplexek jelentős mennyiségű antitestet tartalmaznak [219]. Eredményeink szerint a detergenskezelés lényegében eliminálja az EV-ket, míg nem befolyásolja az immunkomplexek mérését [134].

Számos korábban publikált megfigyelés értelmezésében okozhat problémát az immunkomplexek és az MP-k párhuzamos mérése. Egy holland munkacsoport 2007-ben közölt eredményei szerint [221] az RA-s betegek synovialis folyadékában található MV-k IgG-t, IgM-et, C3, C4 komplementfaktorokat és CRP-t tartalmazhatnak. A szerzők áramlási citometriával az MV-kapun belül ábrázolódó jeleket vizsgálták, nem alkalmaztak annexinfestést, így feltehetően jelentős részben immunkomplexeket vizsgáltak. Az immunkomplexek számának vizsgálata detergensmódszerrel minden olyan esetben hasznos lehet, amikor a vizsgálandó minta EV-k mellett immunkomplexeket is tartalmazhat (pl. szérum vagy synovialis folyadék vizsgálata esetén).

Saját korábbi eredményeinket is újraértékeljük az MV-k detergensérzékenységének ismeretében. SLE-s és kontroll személyekből származó vérplazma-eredetű mikrovesiculák áramlási citometriás vizsgálata alapján igen magas számú extracelluláris vesiculát találtunk. Későbbi vizsgálataink alapján azonban kiderült, hogy ezek a struktúrák jelentős részben immunkomplexek voltak, amelyek mikrovesicula szerű jelet adtak áramlási citometriával vizsgálva [222]. Különösen fontos a detergensmódszer alkalmazása szisztémás autoimmun

betegek mintáinak vizsgálata során, így SLE-ben és RA-ban, hiszen mindkét betegségben ismert a fokozott immunkomplex-képződés.

A CD4 T-sejtek meghatározó szerepe jól ismert RA-ban (lásd a **3.2.4.3. fejezetet is**), ugyanakkor CD8 T-lymphocyták jelentős számban megtalálhatóak az RA-s betegek synovialis folyadékában [16, 223, 224]. Korábbi megfigyelések alapján a CD8 T-sejteknek az ektópiás germinális centrumok kialakulásában meghatározó szerepük van [225]. A CD8 MV-k jelentős CD8 T-lymphocyt-aktivációra utalnak. A JIA-ban mért alacsony CD19⁺ MV-szám az alkalmazott gyógyszeres kezeléssel lehet összefüggésben, a B-lymphocyták alapvető szerepet játszanak a JIA patogenezisében [226]. Korábbi megfigyelések szerint a polyarticularis formában jelentősebb a B-sejt aktiváció, mint az általunk tanulmányozott oligoarticularis formában [227].

RA-s és arthrosisos betegek synovialis fibroblast eredetű mikrovesiculáiban (lásd **6.7. fejezet**) GusB- [128] és HexD- [129] enzim-aktivitást mértünk. Ez a megfigyelés igazolja, hogy az EV-k jelentős mennyiségű enzimet tartalmazhatnak, így szerepük lehet az RA-ban megfigyelhető porcdestrukcióban.

7. Az új tudományos eredmények összefoglalása, gyakorlati jelentősége

7.1. A tudományos eredmények összefoglalása

Az értekezésben bemutatott kísérletes munka fontosabb új eredményei, a célkitűzések szerint:

I: Természetes autoantitestek vizsgálata RA-ban

- A természetes autoantitestek közé tartozó anti-GAG antitestek szintje RA-s betegek szérummintáiban magasabb, mint az egészséges kontrollokban.

II: Genetikai polimorfizmusok tanulmányozása

- A galectin 8 rs2737713 TT genotípus az 50 évesnél idősebbek körében RA-ra hajlamosít, míg a fiatalabb populációban védő szerepe van (antagonisztikus pleiotropia). RA-val nem asszociál az rs4950928 és rs10399931 HCgp-39 polimorfizmus.

III: A citrullináció szerepének vizsgálata a tolerancia elvesztésében; citrullinált proteinek elleni antitestek specifitásának és antigénkötésének vizsgálata

- Tüdőrákos betegek mintáinak vizsgálata alapján a citrullinált proteinek és a PAD4 enzim jelenléte nem feltétlenül vezet citrullinált proteinek elleni antitestek termelődéséhez és autoimmun betegség kialakulásához. A citrullináció mértéke nem tért el a dohányos és a nem dohányos betegek mintáiban. Tumoros szövetek PAD4- és a CK7-festődése igen jól korrelált.
- Citrullinált aggregátum immundomináns epitop peptiddel történt immunizációt majd a citrullinált peptiddel történő *in vitro* restimulációt követően a nyirokcsomósejtek IFN- γ -termelése magasabb a nem citrullinált peptiddel történő restimulációhoz képest.
- Az N- vagy C-terminális biotinizáció nem befolyásolja érdemben az ACPA antitest kötődését 19 aminosavból álló citrullinált peptid esetében, míg az 5 aminosavból álló peptid N-terminális biotinizációja gátolta az antitest kötődését.
- Az RA-s betegek autoantitestjei a kereskedelmi forgalomban elérhető ACPA ELISA-kitekhez hasonlóan reagálnak citrullinált filaggrin, vimentin és kollagén peptidekkel.

IV: C1-inhibitor elleni antitestek SLE-ben

- Az anti C1-inhibitor szérumszintje magasabb volt az SLE-s betegek mintáiban, mint az egészséges kontrollokéban. Az SLE-s betegek 17,3 százalékában mértünk a kontrollok átlag + kétszeres szórás értékét meghaladó C1-inhibitor-szintet.

V: Az NO szerepének vizsgálata a T-lymphocyta-aktivációban

- Humán T-lymphocytákban az eNOS és az nNOS expresszálódik, a T-lymphocyta-aktiváció az eNOS- és nNOS-protein-szinteket többszörösére növeli.
- A T-lymphocyta-aktiváció során termelődő NO hozzájárul a sejtaktivációhoz és a mitokondriális membránpotenciál növekedéséhez.
- Több és nagyobb mitokondriumot tartalmaznak az SLE-s betegek T-lymphocytái, mint az egészséges kontrollokból nyert sejtek.
- Az SLE-s betegek monocytái lényegesen több NO-t termelnek, míg a T-sejtek NO termelése nem fokozott lupusban az egészséges kontrollokéhoz képest.
- A gyors Ca^{2+} -szignál nagyobb, a fenntartott Ca^{2+} -szignál kisebb SLE-s betegek T-lymphocytáiban. A Ca^{2+} -szignál megváltozásához hozzájárul a monocytákból származó NO-termelés és a következményes mitokondrium-bioszintézis.
- Az RA-s betegek T-lymphocytáinak NO-termelése fokozott az egészséges kontrollokból szeparált T-lymphocytákhoz képest.
- TNF- α -blokkoló kezelés mellett az RA-s betegek T-lymphocytáinak NO-termelése csökken.
- Hisztamin hiányában a HDC-KO egerek lépsejtjeinek IFN- γ termelése mind protein, mind mRNS-szinten nagyobb mértékű, mint a vad típusú állat lépsejtjeinek az IFN- γ -termelése.
- A hisztamin az NO-termelés szabályozása révén is hatással van a T-lymphocyták citokintermelésére és jelátviteli folyamataira.

VI: A CD3- ζ -expresszió szabályozásának vizsgálata

- A TNF- α dózisfüggő módon, szelektíven és reverzibilisen csökkenti a CD3- ζ -lánc kifejeződését humán CD4 T-sejteken.
- A TNF- α -kezelés csökkenti az anti-CD3 antitest-stimulációra mérhető Ca^{2+} -szignált és IL-2-termelést.
- A TNF- α -kezelés fokozza a SLAP mennyiségét és a CD3- ζ -lánc proteaszómális lebomlását.
- RA-s betegek T-sejtjeiben a SLAP expressziója nagyobb az egészséges kontrollokénál. A TNF- α -blokkoló kezelésben részesülő betegek CD4 T-lymphocytáinak TNF- α -kezelése nem fokozza a SLAP kifejeződését.

VII: A glikozidázok szerepének vizsgálata RA-ban

- A HCgp-39, a HexA és a HexB is expresszáldott a synovialis fibroblastokban.
- TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-17 és NOC-18 gátolja vagy érdemben nem befolyásolja RA-s és arthrosisos betegek térdízületéből izolált fibroblastok Hc-gp 39-, HexA-, HexB- és GusB-expresszióját.
- A nem hőérzékeny HexD enzim a felelős a synovialis mintákban mérhető galaktózaminidáz-aktivitás jelentős részéért.
- RA-s és arthrosisos betegek synovialis fibroblast eredetű mikrovesiculáiban GusB- és HexD-enzimaktivitás mérhető.

VIII: Extracelluláris vesiculák karakterizálása és vizsgálata

- Triton X-100-kezelést követően az annexinpozitív és a CD41-pozitív események száma (MV-k) jelentősen csökken, míg az IgG- és IgM-jelöléssel ábrázolódó struktúrák (immunkomplexek) mennyisége nem változott.
- Az RA-s betegek synovialis mintáiban nagyobb mennyiségben található CD8⁺ MV, mint az arthrosisos betegek esetében, ugyanakkor a CD4⁺ MV-k számában nem találtunk különbséget a két betegcsoport között.

7.2. A tudományos eredmények potenciális gyakorlati jelentősége

- A természetes autoantitestek mérése a természetes immunválasz aktivitását tükröző információ lehet RA-ban.
- A galectin 8 vizsgálata hozzájárulhat a betegség genetikai hátterének pontosabb felméréséhez.
- A citrullinációnak a tolerancia áttörésében játszott szerepére irányuló munkánk eredményei hozzájárulhatnak az utóbbi időben egyre inkább vizsgált, a betegség megelőzését szolgáló terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez.
- A PAD4-festés alkalmas lehet a tumoros szövetek elkülönítésére.
- Az N- és a C-terminális biotinizáció hatását is érdemes vizsgálni különböző hosszúságú linkerek alkalmazása mellett, különösen rövid peptidek elleni antitestek mérésére szolgáló új ACPA ELISA tesztek fejlesztése során, az antitestkötődés optimalizálása érdekében.
- Az általunk szintetizált peptidek alkalmasak lehetnek a citrullinált proteinekkal reagáló antitesteket tartalmazó, de a rutin diagnosztikai módszerekkel álnegatív eredményt adó minták azonosítására.
- Az NO-termelés mérése potenciális biomarker, míg az NO-gátlás potenciális terápiás célpont RA-ban és SLE-ben.
- A SLAP terápiás célpont lehet RA-ban.
- A detergens módszer alkalmas biológiai mintákban (ízületi folyadék, szérum) az immunkomplexek és az EV-k mennyiségének mérésére.
- Az MV-k mint biomarkerek alkalmasak lehetnek a synovialis sejtaktiváció vizsgálatára.

8. Saját publikációk jegyzéke, tudománymetriai adatok

8.1. Az értekezés alapját képező közlemények

- 1: Buzas EI, György B, **Nagy G**, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2014; Feb 18. doi: 10.1038/nrrheum.2014.19.

- 2: Babos F, Szarka E, **Nagy G**, Majer Z, Sármay G, Magyar A, Hudecz F. Role of N- or C-terminal biotinylation in autoantibody recognition of citrullin containing filaggrin epitope peptides in rheumatoid arthritis. *Bioconjug Chem*. 2013; May 15;24(5):817-27.

- 3: Szarka E, Babos F, Magyar A, Huber K, Szittner Z, Papp K, Prechl J, Pozsgay J, Neer Z, Adori M, **Nagy G**, Rojkovich B, Gáti T, Kelemen J, Baka Z, Brózik M, Pazár B, Poór G, Hudecz F, Sármay G. Recognition of new citrulline-containing peptide epitopes by autoantibodies produced in vivo and in vitro by B cells of rheumatoid arthritis patients. *Immunology*. 2014; Feb;141(2):181-91.

- 4: Misják P, Bősze S, Horváti K, Pásztói M, Pálóczi K, Holub MC, Szakács F, Aradi B, György B, Szabó TG, **Nagy G**, Glant TT, Mikecz K, Falus A, Buzás EI. The role of citrullination of an immunodominant proteoglycan (PG) aggrecan T cell epitope in BALB/c mice with PG-induced arthritis. *Immunol Lett*. 2013; Apr 8;152(1):25-31.

- 5: György B, Szabó TG, Turiák L, Wright M, Herczeg P, Lédeczi Z, Kittel A, Polgár A, Tóth K, Dérfalvi B, Zelenák G, Böröcz I, Carr B, **Nagy G**, Vékey K, Gay S, Falus A, Buzás EI. Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS One*. 2012; 7(11):e49726.

- 6: Pásztói M, Sódar B, Misják P, Pálóczi K, Kittel A, Tóth K, Wellinger K, Géher P, **Nagy G**, Lakatos T, Falus A, Buzás EI. The recently identified hexosaminidase D enzyme substantially contributes to the elevated hexosaminidase activity in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett*. 2012; Oct 23. doi:pii: S0165-2478(12)00224-6.

- 7: Érsek B, Molnár V, Balogh A, Matkó J, Cope AP, Buzás EI, Falus A, **Nagy G**. CD3ζ-chain expression of human T lymphocytes is regulated by TNF via Src-like adaptor protein-dependent proteasomal degradation. *J Immunol*. 2012; Aug 15;189(4):1602-10.

- 8: Pál Z, Antal P, Srivastava SK, Hullám G, Semsei AF, Gál J, Svébis M, Soós G, Szalai C, André S, Gordeeva E, **Nagy G**, Kaltner H, Bovin NV, Molnár MJ, Falus A, Gabius HJ, Buzás EI. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in genes for immunoregulatory galectins: Association of galectin-8 (F19Y) occurrence with autoimmune diseases in a Caucasian population. *Biochim Biophys Acta*. 2012; Oct;1820(10):1512-8.

- 9: Baka Z, György B, Géher P, Buzás EI, Falus A, **Nagy G**. Citrullination under physiological and pathological conditions. *Joint Bone Spine*. 2012; Oct;79(5):431-6.

- 10: Baka Z, Barta P, Losonczy G, Krenács T, Pápay J, Szarka E, Sármay G, Babos F, Magyar A, Géher P, Buzás EI, **Nagy G**. Specific expression of PAD4 and citrullinated proteins in lung cancer is not associated with anti-CCP antibody production. *Int Immunol*. 2011; Jun;23(6):405-14.

- 11: György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, **Nagy G**, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011; May 11.

- 12: György B, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, **Nagy G**, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzás EI. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*. 2011; Jan 27;117(4):e39-48.

- 13: **Nagy G**, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzás E, Perl A. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):210.

- 14: Srivastava SK, Antal P, Gál J, Hullám G, Semsei AF, **Nagy G**, Falus A, Buzás EI. Lack of evidence for association of two functional SNPs of CHI3L1 gene (HCgp-39) with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2010; Mar 19. DOI: 10.1007/s00296-010-1396-3.

- 15: Mészáros T, Füst G, Farkas H, Jakab L, Temesszentandrás G, **Nagy G**, Kiss E, Gergely P, Zeher M, Grieger Z, Czirják L, Hóbor R, Haris A, Polner K, Varga L. C1-inhibitor autoantibodies in SLE. *Lupus* 2010; 19(5):634-8.

- 16: Baka Z, Buzás E, **Nagy G**. Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11(4):238. DOI: 10.1186/ar2751.

- 17: Pásztói M, **Nagy G**, Géher P, Lakatos T, Tóth K, Wellinger K, Póczy P, György B, Holub MC, Kittel A, Pálóczy K, Mazán M, Nyirkos P, Falus A, Buzas EI. Gene expression and activity of cartilage degrading glycosidases in human rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11(3):R68. DOI: 10.1186/ar2697.

- 18: György B, Tóthfalusi L, **Nagy G**, Pásztói M, Géher P, Lőrinc Z, Polgár A, Rojkovich B, Ujfalussy I, Poór G, Póczy P, Wiener Z, Misják P, Koncz A, Falus A, Buzás EI. Natural autoantibodies reactive with glycosaminoglycans in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10(5):R110 DOI: 10.1186/ar2507.

- 19: **Nagy G**, Clark JM, Buzas E, Gorman C, Pasztoi M, Koncz A, Falus A, Cope AP. Nitric oxide production of T lymphocytes is increased in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett*. 2008; Jun 15;118(1):55-8.

- 20: Koncz A, Pasztoi M, Mazan M, Fazakas F, Buzas E, Falus A, **Nagy G**. Nitric oxide mediates T cell cytokine production and signal transduction in histidine decarboxylase knockout mice. *J Immunol*. 2007; Nov 15;179(10):6613-9.

- 21: **Nagy G**, Clark JM, Buzás EI, Gorman CL, Cope AP. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. *Immunol Lett*. 2007; Jul 31;111(1):1-5.

- 22: **Nagy G**, Perl A. Nitric Oxide, Mitochondrial Hyperpolarization and T-Cell Activation *Free Radical Biology and Medicine*. 2007; Jun 1;42(11):1625-31.

- 23: **Nagy G**, Perl A. The role of nitric oxide in abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2006; Feb-Mar;118(2-3):145-51. 2006 Jan 10.

- 24: **Nagy G**, Koncz A, Perl A. T- and B-cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. Crit Rev Immunol. 2005; 25(2):123-40.
- 25: **Nagy G**, Koncz A, Philips PE, Perl A. Mitochondrial signal transduction abnormalities in systemic lupus erythematosus Curr Immunol Rev 2005; 1:61-67.
- 26: **Nagy G**, Barcza M, Gonchoroff N, Phillips PE, Perl A. Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca^{2+} signaling profile of lupus T cells. J Immunol 2004; 173:3676-3683.
- 27: Perl A, Gergely P Jr, **Nagy G**, Koncz-A, Banki K. Mitochondrial hypepolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. Trends Immunol 2004; 25:360-367.
- 28: Perl A, **Nagy G**, Gergely P, Puskas F, Qian Y, Banki K. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. Methods Mol Med. 2004; 102:87-114.
- 29: **Nagy G**, Koncz A, Perl A. T cell activation induced mitochondrial hyperpolarization is mediated by Ca^{2+} and redox dependent production of nitric oxide. J Immunol 2003; 171:5188-5197.

8.2. További közlemények, könyvfejezetek

- 1: van Vollenhoven RF, **Nagy G**, Tak PP. Early start and stop of biologics: has the time come? BMC Med. 2014; Feb 6;12:25. doi: 10.1186/1741-7015-12-25.

- 2: Timár CI, Lorincz AM, Csépanyi-Kömi R, Vályi-Nagy A, **Nagy G**, Buzás EI, Iványi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR, Ligeti E. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. Blood. 2013; Jan 17;121(3):510-8.

- 3: Mong N, Géher P, **Nagy G**. Az IL-12 citokinsalád központi szerepe az immunválasz kialakításában. Immunológiai Szemle. 2013; 5:(4) pp. 19-22.

- 4: Szabó-Taylor KE, **Nagy G**, Eggleton P, Winyard PG. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis In: Alcaraz Maria Jose, Gualillo Oreste, Sánchez-Pernaute Olga (szerk.) Studies on Arthritis and Joint Diseases. 683 p. Dordrecht: Springer - Business Media B.V., 2013; pp. 145-167.

- 5: Gaujoux-Viala C, Knevel R, Mandl P, **Nagy G**, Frank M, Machado P, Hatemi G, Buch MH, Aletaha D, Gossec L; EMEUNET working group. Who are the young professionals working in the field of rheumatology in Europe and what are their needs? An EMEUNET (EMerging EUlar NETwork) survey. Ann Rheum Dis. 2012; Aug;71(8):1432-3.

- 6: Marton N, Buzás E, Géher P, Falus A, **Nagy G**. Az osteoclastok aktivitásának humorális és farmakológiai szabályozása. Immunológiai Szemle 2012; 4(2):11-15.

- 7: Baricza E, Buzás E, Falus A, **Nagy G**. Az immunglobulin evolúciója. Mediart 2012; 1:3-6.

- 8: Pállinger É, Buzás E, Falus A, **Nagy G**, Holub MC, Tóth S, Kőhidai L, Pál Z, Fülöp AK (szerk.). Immunológiaia szemináriumok (e-book). Budapest: Semmelweis Egyetem, 2012; 223 p.

- 9: Sarmay G, Szarka E, Pozsgay J, Szili D, Babos F, **Nagy G**, Rojkovich B, Magyar A, Hudecz F. Citrullin-containing peptides as B-cell epitopes. In: Kiss T, Perczel A (szerk.). 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences 4 ECCLS. 126 p. Konferencia helye,

ideje: Budapest, Magyarország, 2011.08.31-2011.09.03. Bologna, Medimond International Proceedings,. 2011; pp. 95-103.

10: Szappanos Á, Fritsch K, Géher P, **Nagy G**. A rheumatoid arthritis 2010-es klasszifikációs kritériumai. Háziorvosi Továbbképző Szemle 2011; 16 (8):394-397.

11: Koncz Á, Kelemen J, Kelenhegyi K, Géher P, **Nagy G**. Biológiai terápia a rheumatoid arthritis kezelésében. Háziorvosi Továbbképző Szemle 2011; 16(9):463-465.

12: **Nagy G**. A reumatológiai betegségek pathogenezeise. In: Szekanecz Zoltán (szerk.) Reumatológia: egyetemi jegyzet. Budapest: SpringMed Kiadó, 2011; pp. 33-55.

13: Baka Z, Tóth S, Buzás EI, Falus A, **Nagy G**. A nem szerepe rheumatoid arthritisben. Magyar Reumatológia 2011; 52(2):91-95.

14: Pásztói M, Misják P, György B, Aradi B, Szabó GT, Szántó B, Holub MC, **Nagy G**, Falus A, Buzás EI. Infection and autoimmunity: Lessons of animal models. Eur J Microb Immunol 2011; 1:(3) pp. 198-207.

15: Baka Z, Senolt L, Vencovsky J, Mann H, Simon PS, Kittel A, Buzás E, **Nagy G**. Increased serum concentration of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis. Immunol Lett. 2010; Feb 16;128(2):124-30.

16: Toth K, Barna I, **Nagy G**, Wellinger K, Horvath G, Bender T. Synovial fluid β -endorphin level in avascular necrosis, rheumatoid arthritis, and osteoarthritis of the femoral head and knee. A controlled pilot study. Clin Rheumatol. 2010; Sep 21.

17: Baka Z, **Nagy G**. Nanoantitestek. Magyar Reumatológia 2010; 51(4):278-280.

18: Baka Z, **Nagy G**. Biomechanika egy kicsit más szemmel. Mediart 2010; 3:3-6.

19: **Nagy G**, Kiss E. Legfontosabb kérdések és válaszok a lupusról. Budapest: Magyar Lupus Egyesület, 2010; pp. 1-23.

- 20: **Nagy G.** Kortikoszteroid és immunszuppresszív terápia. In: Szekanecz Z (szerk.) Reumatológiai gyógyszeres terápia. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 2009; pp. 51-90.
- 21: Koncz Á, **Nagy G.** A D-vitamin felfedezésétől napjainkig. Mediart 2009; 1(2):18-20.
- 22: Szabó TG, Palotai R, Antal P, Tokatly I, Tóthfalusi L, Lund O, **Nagy G**, Falus A, Buzás EI. Critical role of glycosylation in determining the length and structure of T cell epitopes. Immunome Res. 2009; Sep 24;5:4.
- 23: Oláh M, Koncz A, Fehér J, Kálmánczhey J, Oláh C, Balogh S, **Nagy G**, Bender T. The effect of balneotherapy on C-reactive protein, serum cholesterol, triglyceride, total antioxidant status and HSP-60 levels. Int J Biometeorol. 2010; May;54(3):249-54.
- 24: Wiener Z, Pocza P, Racz M, **Nagy G**, Tolgyesi G, Molnar V, Jaeger J, Buzas E, Gorbe E, Papp Z, Rigo J, Falus A. IL-18 induces a marked gene expression profile change and increased Ccl1 (I-309) production in mouse mucosal mast cell homologs. Int Immunol. 2008; Dec;20(12):1565-73.
- 25: Qian Y, Banerjee S, Grossman CE, Amidon W, **Nagy G**, Barcza M, Niland B, Karp DR, Middleton FA, Banki K, Perl A. Transaldolase deficiency influences the pentose phosphate pathway, mitochondrial homeostasis and apoptosis signal processing. Biochem J. 2008; Oct 1;415(1):123-34.
- 26: **Nagy G.** Szolubilis receptorok és TNF-blokkolás. Magyar Reumatológia 2008; 49:188-189.
- 27: Gáti T, Pajor A, Géher P, **Nagy G.** Systemic Lupus Erythematosus and pregnancy. Orvosi Hetilap 2008; 149(16):723-731.
- 28: Perl A, **Nagy G**, Koncz A, Gergely P, Fernandez D, Doherty E, Telarico T, Bonilla E, Phillips PE. Molecular mimicry and immunomodulation by the HRES-1 endogenous retrovirus in SLE. Autoimmunity. 2008; May;41(4):287-97.

- 29: **Nagy G**, Géher P. Génexpresszió gyulladásos reumatológiai betegségekben: kommentár. Orvostovábbképző Szemle 2007; 14(12):24-25.
- 30: Ilniczky S, Kamondi A, Aranyi Z, Varallyay G, Gaal B, Szirmai I, **Nagy G**. Simultaneous central and peripheral nervous system involvement in systemic lupus erythematosus. Ideggyogy Sz. 2007; 60(9-10):398-402.
- 31: Bender T, **Nagy G**, Barna I, Tefner I, Kádas E, Géher P. The effect of physical therapy on beta-endorphin levels. Eur J Appl Physiol. 2007; Jul;100(4):371-82.
- 32: **Nagy G**, Ward J, Mosser DD, Koncz A, Gergely P, Stancalo C, Qian YM, Fernandez D, Niland B, Grossmann CE, Telanco T, Banki K, Perl A. Regulation of CD4 expression via recycling by HRES-1/RAB4 controls susceptibility to HIV infection. J Biol Chem. 2006; Aug 24;281:34574-34591.
- 33: **Nagy G**. Korai arthritis és korai rheumatoid arthritis: új adatok: kommentár. Orvostovábbképző Szemle. 2006; 13(9):104-106.
- 34: **Nagy G**, Géher P, Koncz A, Perl A. Jelátviteli defektusok szisztémás lupus erythematosusban. Orvosi Hetilap. 2005; 146(31):1625-1630.
- 35: Kerényi Á, **Nagy G**, Veres A, Varga L, Füst A, Nagymihány A, Czumbel N, Suveges I, Füst G. C1r-C1s-C1inhibitor (C1rs-C1inh) complex measurements in tears of patients before and after penetrating keratoplasty. Curr Eye Res 2002; Feb;24(2):99-104.
- 36: **Nagy G**, Horváth A, Füst G, Romics L, Gergely P, Karádi I. Anticholesterol antibody levels in patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 2001; 60:722-723.
- 37: **Nagy G**, Brozik M, Tornoci L, Gergely P. Diagnostic value of combined evaluation of neopterin and anti-DNA antibody levels for assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Rheumatol 2000; 18:699-705.
- 38: **Nagy G**, Pallinger E, Antal-Szalmas P, Aleksza M, Marschalko M, Brozik M, Falus A, Gergely P. Measurement of intracellular interferon-gamma and interleukin-4 in whole blood

T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. Immunology Letters 2000; 74:207-210.

39: **Nagy G**, Brozik M, Varga L, Füst G, Kirschfink M, Kiss E, Gergely P. Usefulness of detection of complement activation products in evaluating SLE activity. Lupus 2000; 9:19-25.

40: Csiszár A, **Nagy G**, Gergely P, Pozsonyi T, Pocsik E. Increased interferon-gamma (IFN- λ), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Clin Exp Immunol 2000; 122:464-470.

41: Rohács T, **Nagy G**, Spät A. Cytoplasmatic Ca²⁺ signalling and reduction of mitochondrial pyridine nucleotides in adrenal glomerulosa cells in response to K⁺, angiotensin II and vasopressin. Biochem J 1997; 322:785-792.

8.3. Tudománymetriai adatok**Impakt faktor**

Az értekezés alapját képező közlemények:	129,85
A PhD-dolgozatban nem szereplő további közlemények:	44,53
A PhD-dolgozatban szereplő közlemények:	8,22
Összesen:	182,6

Hivatkozások száma

Összes hivatkozások száma:	1280
Független hivatkozások száma:	1051

Hirsch index

18

9. Köszönetnyilvánítás

Elsőként **Buzás Edit professzor asszonynak**, a Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológia Intézet igazgatójának tartozom köszönettel, akinek tudományos eredményeimben, kutatóvá válásomban meghatározó szerepe volt, és az elmúlt több mint egy évtizedes közös munkánk során irányította és mindenben segítette tudományos tevékenységemet.

Köszönettel tartozom **Falus András professzor úrnak**, akinek előadásait hallgatva egyetemistaként megszerettem az immunológiát, és aki később lehetőséget biztosított a kísérleteim megvalósításához. Hálás vagyok **Géher Pál professzor úrnak**, aki a napi klinikai tevékenység mellett is lehetővé tette és támogatta kutatómunkám folytatását. **Perl András professzor úrnak** köszönöm, hogy irányításával a syracuse-i egyetemen dolgozhattam. Köszönöm **Bender Tamás** és **Gömör Béla professzor urak** támogatását.

A kutatást az Élettani Intézet diákköröseként szerettem meg, hálás vagyok **Rohács Tibor** és **Spät András professzoroknak**, akik tudományos pályám indításában sokat segítettek. Szeretnék köszönetet mondani **Ligeti Erzsébet professzor asszonynak** tanácsaiért, támogatásáért. Köszönettel tartozom korábbi tanárainknak, **Gergely Péter** és **Karádi István professzoroknak** tudományos és klinikai ambícióim megvalósításában nyújtott folyamatos támogatásukért.

Köszönettel tartozom korábbi és jelenlegi PhD hallgatóimnak: **Baka Zsuzsannának**, **Baricza Eszternek**, **Érsek Barbarának** és **Marton Nikolettnek**. Hálás vagyok **Magyar Anna** és **Sármay Gabriella professzor asszonyoknak** az elmúlt években végzett közös munka lehetőségéért. Köszönöm **Andrew P Cope**, **Iain B. McInnes** és **Steffen Gay professzoroknak**, hogy lehetőséget biztosítottak nemzetközi szintű kollaborációk megteremtésére. Köszönettel tartozom minden hazai és külföldi kollégának, akikkel volt alkalmam kísérletes vagy klinikai területen közös projekteken részt venni. Szeretném megköszönni a Budai Irgalmasrendi Kórházban és a Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetben dolgozó minden munkatársamnak, hogy türelmükkel és megértésükkel támogatták munkámat. Köszönettel tartozom **Füst György professzor úrnak**

és **Kelemen Judit főorvos asszonynak**, akik támogatták, segítették kutatásaimat, de sajnos a doktori munkám elkészültét már nem érhatték meg.

Szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, akiknek pályaválasztásomban, orvossá válásomban meghatározó szerepük volt és ma is féltő szemmel követik karrieremet. Hálás vagyok feleségemnek, **Koncz Ágnesnek**, aki az ideális családi háttér biztosítása mellett éveken át munkatársamként is jelentősen hozzájárult kutatásaim eredményességéhez. Köszönöm gyermekeimnek, **Annabellának** és **Barbarának** szerető türelmét és a munkámmal járó csaknem folyamatos elfoglaltság megértését.

10. Irodalomjegyzék

-
- 1 Erdei A, Sármai G, Prechl J (eds). Immunológia. Medicina Kiadó, Budapest; 2012.
 - 2 Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É (eds). Az immunológia alapjai. Semmelweis Kiadó, Budapest; 2007.
 - 3 Manno K, Matejuk A, Xu Y, Beardall M, Chen C. Expression of natural autoantibodies in MRL-lpr mice protects from lupus nephritis and improves survival. J Immunol. 2012 Apr 15;188(8):3628-38.
 - 4 Nagy G. A reumatológiai betegségek patogenezise. In: Szekanecz Z (ed): Reumatológia: egyetemi jegyzet. SpringerMed, Budapest; 2011. pp. 33-54.**
 - 5 Ermann J, Fathman CG. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. Nat Immunol. 2001 Sep;2(9):759-61.
 - 6 Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1987 Nov;30(11):1205-13.
 - 7 Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. Am J Hum Genet. 2004 Aug;75(2):330-7.
 - 8 Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 2011 Dec 1; 365 (22): 2110-21.

-
- 9 Menard L, Saadoun D, Isnardi I, Ng YS, Meyers G, Massad C, Price C, Abraham C, Motaghedi R, Buckner JH, Gregersen PK, Meffre E. The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3635-44.
- 10 Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2009 Aug;33(1):3-11.
- 11 Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG, Silman AJ. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum*. 1997 Nov;40(11):1955-61.
- 12 Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Rönnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantapää-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L, Alfredsson L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006 Jan;54(1):38-46.
- 13 Lee HS, Irigoyen P, Kern M, Lee A, Batliwalla F, Khalili H, Wolfe F, Lum RF, Massarotti E, Weisman M, Bombardier C, Karlson EW, Criswell LA, Vlietinck R, Gregersen PK. Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: a mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum*. 2007 Jun;56(6):1745-53.
- 14 Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Rönnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AH, Toes RE, Huizinga TW, Klareskog L, Alfredsson L. Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis study group. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. 2007 May;80(5):867-75.
- 15 Salliot C, Dawidowicz K, Lukas C, Guedj M, Paccard C, Benessiano J, Dougados M, Nicaise P, Meyer O, Dieudé P. PTPN22 R620W genotype-phenotype correlation analysis and

gene-environment interaction study in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Oct;50(10):1802-8.

16 McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):429-42.

17 McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011 Dec 8;365(23):2205-19.

18 Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2009 Feb 21;373(9664):659-72.

19 Padyukov L, Seielstad M, Ong RT, Ding B, Rönnelid J, Seddighzadeh M, Alfredsson L, Klareskog L. Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (EIRA) study group. A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Feb;70(2):259-65.

20 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010 Sep;69(9):1580-8.

21 Nienhuis RL, Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis; the antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis*. 1964 Jul;23:302-5.

22 Szekanecz Z, Soós L, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, Végvári A, Sipka S, Szücs G, Szántó S, Lakos G. Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: as good as it gets? *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008 Feb;34(1):26-31.

23 Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J*. 1979 Jul 14;2(6182):97-9.

24 Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessière C, Girbal E, Durieux JJ, Serre G. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1995 Jun;95(6):2672-9.

25 Brown SJ, McLean WH. One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol*. 2012 Mar;132(3 Pt 2):751-62.

26 Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):273-81.

27 Girbal-Neuhausser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson-Bessière C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M, Serre G. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol*. 1999 Jan 1;162(1):585-94.

28 D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2007 Feb 17;369(9561):587-96.

29 Ceppellini R, Polli E, Celada F. A DNA-reaction factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffuses. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957;96:572-74.

30 Robbins WD, Holman HR, Deicher H, Kunkel HG. Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. *Proc Soc Exp Biol* 1957;9:575-9.

31 Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, Bruce IN, Isenberg D, Wallace DJ, Nived O, Sturfelt G, Ramsey-Goldman R, Bae SC, Hanly JG, Sánchez-Guerrero J, Clarke A, Aranow C, Manzi S, Urowitz M, Gladman D, Kalunian K, Costner M, Werth VP, Zoma A, Bernatsky S, Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Jacobsen S, Buyon JP, Maddison P,

Dooley MA, van Vollenhoven RF, Ginzler E, Stoll T, Peschken C, Jorizzo JL, Callen JP, Lim SS, Fessler BJ, Inanc M, Kamen DL, Rahman A, Steinsson K, Franks AG Jr, Sigler L, Hameed S, Fang H, Pham N, Brey R, Weisman MH, McGwin G Jr, Magder LS. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012 Aug;64(8):2677-86.

32 Nagy G, Brózik M, Tornóci L, Gergely P. Diagnostic value of combined evaluation of neopterin and anti-DNA antibody levels for assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2000 Nov-Dec;18(6):699-705.

33 Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003 Oct 16;349(16):1526-33.

34 Heinlen LD, McClain MT, Merrill J, Akbarali YW, Edgerton CC, Harley JB, James JA. Clinical criteria for systemic lupus erythematosus precede diagnosis, and associated autoantibodies are present before clinical symptoms. *Arthritis Rheum.* 2007 Jul;56(7):2344-51.

35 Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89.

36 Zhu J, Jankovic D, Oler AJ, Wei G, Sharma S, Hu G, Guo L, Yagi R, Yamane H, Punkosdy G, Feigenbaum L, Zhao K, Paul WE. The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses. *Immunity.* 2012 Oct 19;37(4):660-73.

37 Tan C, Gery I. The unique features of Th9 cells and their products. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(1):1-10.

38 Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007 Apr;8(4):345-50.

-
- 39 Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest.* 2009 Dec;119(12):3573-85.
- 40 Cannons JL, Lu KT, Schwartzberg PL. T follicular helper cell diversity and plasticity. *Trends Immunol.* 2013 May;34(5):200-7.
- 41 Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010 Jan;11(1):7-13.
- 42 Chavele KM, Ehrenstein MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* 2011 Dec 1;585(23):3603-10.
- 43 Myers MD, Dragone LL, Weiss A. Src-like adaptor protein down-regulates T cell receptor (TCR)-CD3 expression by targeting TCRzeta for degradation. *J Cell Biol.* 2005 Jul 18;170(2):285-94.
- 44 Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature.* 2003;426:454-460.
- 45 Nambiar MP, Fisher CU, Warke VG, Krishnan S, Mitchell JP, Delaney N, Tsokos GC. Reconstitution of deficient T cell receptor zeta chain restores T cell signaling and augments T cell receptor/CD3-induced interleukin-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1948-1955.
- 46 Banki K, Hutter E, Gonchoroff NJ, Perl A. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. *J Immunol.* 1999 Feb 1;162(3):1466-79.
- 47 Gergely P Jr, Grossman C, Niland B et al. Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002;46:175-190.

48 Nagy G, Géher P, Koncz A, Perl A. Signal transduction abnormalities in systemic lupus erythematosus. Orv Hetil. 2005 Jul 31;146(31):1625-30.

49 Buzás EI, Brennan FR, Mikecz K, Garzó M, Negroiu G, Holló K, Cs-Szabó G, Pintye E, Glant TT. A proteoglycan (aggrecan)-specific T cell hybridoma induces arthritis in BALB/c mice. *J Immunol.* 1995 Sep 1;155(5):2679-87.

50 Berlo SE, van Kooten PJ, Ten Brink CB, Hauet-Broere F, Oosterwegel MA, Glant TT, Van Eden W, Broeren CP. Naive transgenic T cells expressing cartilage proteoglycan-specific TCR induce arthritis upon in vivo activation. *J Autoimmun.* 2005 Nov;25(3):172-80.

51 Takeno M, Nagafuchi H, Kaneko S, Wakisaka S, Oneda K, Takeba Y, Yamashita N, Suzuki N, Kaneoka H, Sakane T. Autoreactive T cell clones from patients with systemic lupus erythematosus support polyclonal autoantibody production. *J Immunol.* 1997 Apr 1;158(7):3529-38.

52 Yang M, Rui K, Wang S, Lu L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol.* 2013 Mar;10(2):122-32.

53 Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221-41.

54 Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, Tschopp J, Browning JL. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med.* 1999 Dec 6;190(11):1697-710.

55 Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol.* 2008 Feb;20(1):52-60.

56 Hiasa M, Abe M, Nakano A, Oda A, Amou H, Kido S, Takeuchi K, Kagawa K, Yata K, Hashimoto T, Ozaki S, Asaoka K, Tanaka E, Moriyama K, Matsumoto T. GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor

shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Blood*. 2009 Nov 12;114(20):4517-26.

57 Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science*. 2001 Nov 16;294(5546):1540-3.

58 Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk KI. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood*. 1999 Jun 1;93(11):3956-63.

59 Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008 Dec;10(12):1470-6.

60 Liao CF, Lin SH, Chen HC, Tai CJ, Chang CC, Li LT, Yeh CM, Yeh KT, Chen YC, Hsu TH, Shen SC, Lee WR, Chiou JF, Luo SF, Jiang MC. CSE1L, a novel microvesicle membrane protein, mediates Ras-triggered microvesicle generation and metastasis of tumor cells. *Mol Med*. 2012 Dec 6;18:1269-80.

61 Messer L, Alsaleh G, Freyssinet JM, Zobairi F, Leray I, Gottenberg JE, Sibilia J, Toti-Orfanoudakis F, Wachsmann D. Microparticle-induced release of B-lymphocyte regulators by rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(2):R40.

62 Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*. 2010 Jan 29;327(5965):580-3.

63 Crookston KP, Sibbitt WL Jr, Chandler WL, Qualls CR, Roldan CA. Circulating microparticles in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis*. 2013 Feb;16(1):72-80.

-
- 64 Sellam J, Proulle V, Jünger A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg JE, Toti F, Benessiano J, Gay S, Freyssinet JM, Mariette X. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):R156.
- 65 Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview *J Physiol Pharmacol*. 2002 Dec;53(4 Pt 1):503-14.
- 66 Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Aug;6(8):662-80.
- 67 Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005 Aug;4(4):471-9.
- 68 Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol*. 2002 Jan 31;35(1):116-26.
- 69 Brown-CG. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochem Biophys Acta*. 1999;1411:351-369.
- 70 Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med*. 2002 Dec 1;33(11):1440-50.
- 71 Nisoli E, Clementi E, Paolucci C. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003;299:896-899.
- 72 Pham TN, Rahman P, Tobin YM, Khraishi MM, Hamilton SF, Alderdice C, Richardson VJ. Elevated serum nitric oxide levels in patients with inflammatory arthritis associated with co-expression of inducible nitric oxide synthase and protein kinase C- η in peripheral blood monocyte-derived macrophages. *J Rheumatol*. 2003 Dec;30(12):2529-34.
- 73 Onur O, Akinci AS, Akbiyik F, Unsal I. Elevated levels of nitrate in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2001 May;20(4):154-8.

74 Oates JC, Shaftman SR, Self SE, Gilkeson GS. Association of serum nitrate and nitrite levels with longitudinal assessments of disease activity and damage in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58:263–272.

75 O'Reilly M, Alpert R, Jenkinson S, Gladue RP, Foo S, Trim S, Peter B, Trevethick M, Fidock M. Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils – role in eosinophil chemotaxis. *J Recept Signal Transduct Res*. 2002 Feb-Nov;22(1-4):431-48.

76 Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy*. 2009 Dec;39(12):1786-800.

77 Jones BL, Kearns GL. Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Feb;89(2):189-97.

78 Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature*. 2001 Sep 27;413(6854):420-5.

79 Gutzmer R, Mommert S, Gschwandtner M, Zwingmann K, Stark H, Werfel T. The histamine H4 receptor is functionally expressed on T(H)2 cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Mar;123(3):619-25.

80 Sayed BA, Christy A, Quirion MR, Brown MA. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:705-39.

81 Horváth BV, Szalai C, Mándi Y, László V, Radvány Z, Darvas Z, Falus A. Histamine and histamine-receptor antagonists modify gene expression and biosynthesis of interferon gamma in peripheral human blood mononuclear cells and in CD19-depleted cell subsets. *Immunol Lett*. 1999 Nov 1;70(2):95-9.

82 Jelinek I, László V, Buzás E, Pállinger E, Hangya B, Horváth Z, Falus A. Increased antigen presentation and T(h)1 polarization in genetically histamine-free mice. *Int Immunol*. 2007 Jan;19(1):51-8.

83 Kirschfink M, Mollnes TE. Modern complement analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Nov;10(6):982-9.

84 Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: II. Markers of disease activity. *Arthritis Rheum*. 2004 Jul;50(7):2048-65.

85 Nagy G, Brózik M, Varga L, Füst G, Kirschfink M, Kiss E, Gergely P. Usefulness of detection of complement activation products in evaluating SLE activity. *Lupus*. 2000;9(1):19-25.

86 Low JM, Moore TL. A role for the complement system in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*. 2005; 11 (5): 655-70.

87 Zhao X, Okeke NL, Sharpe O, Batliwalla FM, Lee AT, Ho PP, Tomooka BH, Gregersen PK, Robinson WH. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(4):R94.

88 van Vollenhoven RF. Sex differences in rheumatoid arthritis: more than meets the eye. *BMC Med*. 2009 Mar 30;7:12.

89 Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2001 Sep;2(9):777-80.

90 Somers EC, Marder W, Cagnoli P, Lewis EE, Deguire P, Gordon C, Helmick CG, Wang L, Wing JJ, Dhar JP, Leisen J, Shaltis D, McCune WJ. Population-based incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: The Michigan Lupus Epidemiology & Surveillance (MILES) Program. *Arthritis Rheum*. 2013 Oct 24. doi: 10.1002/art.38238.

91 Molokhia M, McKeigue P. Risk for rheumatic disease in relation to ethnicity and admixture. *Arthritis Res.* 2000;2(2):115-25.

92 Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WV, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Gregersen PK. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2007 Sep 6;357(10):977-86.

93 Orozco G, Sánchez E, González-Gay MA, López-Nevot MA, Torres B, Cáliz R, Ortego-Centeno N, Jiménez-Alonso J, Pascual-Salcedo D, Balsa A, de Pablo R, Nuñez-Roldan A, González-Escribano MF, Martín J. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of *PTPN22*, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism.* 2005;52:219–224.

94 Graham RR, Cotsapas C, Davies L, Hackett R, Lessard CJ, Leon JM, Burtt NP, Guiducci C, Parkin M, Gates C, Plenge RM, Behrens TW, Wither JE, Rioux JD, Fortin PR, Graham DC, Wong AK, Vyse TJ, Daly MJ, Altshuler D, Moser KL, Gaffney PM. Genetic variants near *TNFAIP3* on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2008 Sep;40(9):1059-61.

95 Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, Pe'er I, Burtt NP, Blumenstiel B, DeFelice M, Parkin M, Barry R, Winslow W, Healy C, Graham RR, Neale BM, Izmailova E, Roubenoff R, Parker AN, Glass R, Karlson EW, Maher N, Hafler DA, Lee DM, Seldin MF, Remmers EF, Lee AT, Padyukov L, Alfredsson L, Coby J, Weinblatt ME, Gabriel SB, Purcell S, Klareskog L, Gregersen PK, Shadick NA, Daly MJ, Altshuler D. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2007 Dec;39(12):1477-82.

96 Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Donn R, Symmons D, Hider S, Bruce IN; Wellcome Trust Case Control Consortium, Wilson AG, Marinou I, Morgan A, Emery P; YEAR Consortium, Carter A, Steer S, Hocking L, Reid DM, Wordsworth P,

Harrison P, Strachan D, Worthington J. Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet.* 2007 Dec;39(12):1431-3.

97 Ramos PS, Criswell LA, Moser KL, Comeau ME, Williams AH, Pajewski NM, Chung SA, Graham RR, Zidovetzki R, Kelly JA, Kaufman KM, Jacob CO, Vyse TJ, Tsao BP, Kimberly RP, Gaffney PM, Alarcón-Riquelme ME, Harley JB, Langefeld CD. International Consortium on the Genetics of Systemic Erythematosus. A comprehensive analysis of shared loci between systemic lupus erythematosus (SLE) and sixteen autoimmune diseases reveals limited genetic overlap. *PLoS Genet.* 2011 Dec;7(12):e1002406.

98 Suarez-Gestal M, Calaza M, Dieguez-Gonzalez R, Perez-Pampin E, Pablos JL, Navarro F, Narvaez J, Marenco JL, Herrero-Beaumont G, Fernandez-Gutierrez B, Lamas JR, de la Serna AR, Ortiz AM, Carreño L, Cañete JD, Caliz R, Blanco FJ, Balsa A, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Rheumatoid arthritis does not share most of the newly identified systemic lupus erythematosus genetic factors. *Arthritis Rheum.* 2009 Sep;60(9):2558-64.

99 Schur PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1995 Dec;4(6): 425-37.

100 Graham RR, Ortmann WA, Langefeld CD, Jawaheer D, Selby SA, Rodine PR, Baechler EC, Rohlf KE, Shark KB, Espe KJ, Green LE, Nair RP, Stuart PE, Elder JT, King RA, Moser KL, Gaffney PM, Bugawan TL, Erlich HA, Rich SS, Gregersen PK, Behrens TW. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet.* 2002 Sep;71(3):543-53.

101 Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, Roberts DF. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet.* 1989 Sep;36(3):178-82.

102 Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, Berdasco M, Fraga MF, O'Hanlon TP, Rider LG, Jacinto FV, Lopez-Longo FJ, Dopazo J, Forn M, Peinado MA, Carreño L, Sawalha AH, Harley JB, Siebert R, Esteller M, Miller FW, Ballestar E. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res.* 2010 Feb;20(2):170-9.

103 Karouzakis E, Gay RE, Gay S, Neidhart M. Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 May;5(5):266-72.

104 Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct;28(10):1057-68.

105 Kouri T, Petersen J, Rhodes G, Aho K, Palosuo T, Heliövaara M, Isomäki H, von Essen R, Vaughan JH. Antibodies to synthetic peptides from Epstein-Barr nuclear antigen-1 in sera of patients with early rheumatoid arthritis and in preillness sera. *J Rheumatol*. 1990 Nov;17(11):1442-9.

106 Harley JB, James JA. Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2006;64(1-2):45-50.

107 Takahashi Y, Murai C, Shibata S, Munakata Y, Ishii T, Ishii K, Saitoh T, Sawai T, Sugamura K, Sasaki T. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Jul 7;95(14):8227-32.

108 Ghaussy NO, Sibbitt W Jr, Bankhurst AD, Qualls CR. Cigarette smoking and disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2003 Jun;30(6):1215-21.

109 Studnicka-Benke A, Steiner G, Petera P, Smolen JS. Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors parallel clinical disease and autoimmune activity in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. 1996 Nov;35(11):1067-74.

110 Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, Lakos G, Tincani A, Kontopoulou-Griva I, Galeazzi M, Meroni PL, Derksen RH, de Groot PG, Gromnica-Ihle E, Baleva M, Mosca M, Bombardieri S, Houssiau F, Gris JC, Quéré I, Hachulla E, Vasconcelos C, Roch B, Fernández-Nebro A, Boffa MC, Hughes GR, Ingelmo M; Euro-Phospholipid Project Group. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. 2002 Apr;46(4):1019-27.

111 Panush RS, Edwards NL, Longley S, Webster E. 'Rhumus' syndrome. Arch Intern Med. 1988 Jul;148(7):1633-6.

112 van Vugt RM, Derksen RH, Kater L, Bijlsma JW. Deforming arthropathy or lupus and rhupus hands in systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 1998 Sep;57(9):540-4.

113 Molenaar ET, Voskuyl AE, Familian A, van Mierlo GJ, Dijkmans BA, Hack CE. Complement activation in patients with rheumatoid arthritis mediated in part by C-reactive protein. Arthritis Rheum. 2001 May;44(5):997-1002.

114 Witte T, Hartung K, Sachse C, Matthias T, Fricke M, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schmidt RE. Rheumatoid factors in systemic lupus erythematosus: association with clinical and laboratory parameters. SLE study group. Rheumatol Int. 2000;19(3):107-11.

115 Díaz-Lagares C, Croca S, Sangle S, Vital EM, Catapano F, Martínez-Berriotxo A, García-Hernández F, Callejas-Rubio JL, Rascón J, D'Cruz D, Jayne D, Ruiz-Irastorza G, Emery P, Isenberg D, Ramos-Casals M, Khamashta MA; UK-BIOGEAS Registry. Efficacy of rituximab in 164 patients with biopsy-proven lupus nephritis: pooled data from European cohorts. Autoimmun Rev. 2012 Mar;11(5):357-64.

116 Stohl W, Merrill JT, McKay JD, Lisse JR, Zhong ZJ, Freimuth WW, Genovese MC. Efficacy and safety of belimumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging Study. J Rheumatol. 2013 May;40(5):579-89.

117 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988;31:315-24.

118 Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1982 Nov;25(11):1271-7.

119 Petty RE, Southwood TR, Baum J, Bhattay E, Glass DN, Manners P, Maldonado-Cocco J, Suarez-Almazor M, Orozco-Alcala J, Prieur AM. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol.* 1998 Oct;25(10):1991-4.

120 Baka Z, Barta P, Losonczy G, Krenács T, Pápay J, Szarka E, Sármay G, Babos F, Magyar A, Géher P, Buzás EI, Nagy G. Specific expression of PAD4 and citrullinated proteins in lung cancer is not associated with anti-CCP antibody production. *Int Immunol.* 2011 Jun;23(6):405-14.

121 Nagy G, Koncz A, Perl A. T cell activation-induced mitochondrial hyperpolarization is mediated by Ca²⁺- and redox-dependent production of nitric oxide. *J Immunol.* 2003 Nov 15;171(10):5188-97.

122 Nagy G, Barcza M, Gonchoroff N, Phillips PE, Perl A. Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca²⁺ signaling profile of lupus T cells. *J Immunol* 2004;173:3676-3683.

123 Nagy G, Clark JM, Buzas E, Gorman C, Pasztoi M, Koncz A, Falus A, Cope AP. Nitric oxide production of T lymphocytes is increased in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2008 Jun 15;118(1):55-8.

124 Érsek B, Molnár V, Balogh A, Matkó J, Cope AP, Buzás EI, Falus A, Nagy G. CD3 ζ -chain expression of human T lymphocytes is regulated by TNF via Src-like adaptor protein-dependent proteasomal degradation. *J Immunol.* 2012 Aug 15;189(4):1602-10.

125 Koncz A, Pasztoi M, Mazan M, Fazakas F, Buzas E, Falus A, Nagy G. Nitric oxide mediates T cell cytokine production and signal transduction in histidine decarboxylase knockout mice. *J Immunol.* 2007 Nov 15;179(10):6613-9.

126 Neidhart M, Gay RE, Gay S. Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2000;43:1719-1728.

127 Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods Mol Med* 2007;135:365-75.

128 Pásztói M, Nagy G, Géher P, Lakatos T, Tóth K, Wellinger K, Pócsa P, György B, Holub MC, Kittel A, Pálóczy K, Mazán M, Nyirkos P, Falus A, Buzas EI. Gene expression and activity of cartilage degrading glycosidases in human rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):R68. DOI: 10.1186/ar2697.

129 Pásztói M, Sódar B, Misják P, Pálóczy K, Kittel Á, Tóth K, Wellinger K, Géher P, Nagy G, Lakatos T, Falus A, Buzás EI. The recently identified hexosaminidase D enzyme substantially contributes to the elevated hexosaminidase activity in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2013 Jan;149(1-2):71-6.

130 Nagy G, Holub MC, Nemeth K, Pasztoi M, Mazan M, Koncz A, Falus A, Buzas E. Histidine deficiency does not protect against aggrecan-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(Suppl. 3):P5.

131 Ohtsu H, Tanaka S, Terui T, Hori Y, Makabe-Kobayashi Y, Pejler G, Tchougounova E, Hellman L, Gertsenstein M, Hirasawa N, Sakurai E, Buzás E, Kovács P, Csaba G, Kittel A, Okada M, Hara M, Mar L, Numayama-Tsuruta K, Ishigaki-Suzuki S, Ohuchi K, Ichikawa A, Falus A, Watanabe T, Nagy A. Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS Lett.* 2001 Jul 27;502(1-2):53-6.

132 Hanyecz A, Berlo SE, Szántó S, Broeren CP, Mikecz K, Glant TT. Achievement of a synergistic adjuvant effect on arthritis induction by activation of innate immunity and forcing the immune response toward the Th1 phenotype. *Arthritis Rheum.* 2004 May;50(5):1665-76.

133 Misják P, Bősze S, Horváti K, Pásztói M, Pálóczy K, Holub MC, Szakács F, Aradi B, György B, Szabó TG, Nagy G, Glant TT, Mikecz K, Falus A, Buzás EI. The role of citrullination of an immunodominant proteoglycan (PG) aggrecan T cell epitope in BALB/c mice with PG-induced arthritis. *Immunol Lett.* 2013 Apr 8;152(1):25-31.

134 György B, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzás EI. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. Blood. 2011 Jan 27;117(4):e39-48.

135 György B, Szabó TG, Turiák L, Wright M, Herczeg P, Lédeczi Z, Kittel A, Polgár A, Tóth K, Dérfalvi B, Zelenák G, Böröcz I, Carr B, Nagy G, Vékey K, Gay S, Falus A, Buzás EI. Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. PLoS One. 2012;7(11):e49726.

136 Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. Anal Chem. 2002 Oct 15;74(20):5383-92.

137 Babos F, Szarka E, Nagy G, Majer Z, Sármay G, Magyar A, Hudecz F. Role of N- or C-terminal biotinylation in autoantibody recognition of citrullin containing filaggrin epitope peptides in rheumatoid arthritis. Bioconjug Chem. 2013 May 15;24(5):817-27.

138 Szarka E, Babos F, Magyar A, Huber K, Szittner Z, Papp K, Prechl J, Pozsgay J, Nagy G, Rojkovich B, Gáti T, Kelemen J, Baka Z, Brózik M, Pazár B, Poór G, Hudecz F, Sármay G. Recognition of new citrulline containing peptide epitopes by autoantibodies produced in vivo and in vitro by B cells of Rheumatoid arthritis patients. Immunology. 2013 Oct 1. doi: 10.1111/imm.12175.

139 György B, Tóthfalusi L, Nagy G, Pásztói M, Géher P, Lörinc Z, Polgár A, Rojkovich B, Ujfalussy I, Poór G, Pócza P, Wiener Z, Misják P, Koncz A, Falus A, Buzás EI. Natural autoantibodies reactive with glycosaminoglycans in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2008;10(5):R110 DOI: 10.1186/ar2507

140 Pál Z, Antal P, Srivastava SK, Hullám G, Semsei AF, Gál J, Svébis M, Soós G, Szalai C, André S, Gordeeva E, Nagy G, Kaltner H, Bovin NV, Molnár MJ, Falus A,

Gabius HJ, Buzás EI. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in genes for immunoregulatory galectins: Association of galectin-8 (F19Y) occurrence with autoimmune diseases in a Caucasian population. Biochim Biophys Acta. 2012 Oct;1820(10):1512-8.

141 Mészáros T, Füst G, Farkas H, Jakab L, Temesszentandrás G, Nagy G, Kiss E, Gergely P, Zeher M, Griger Z, Czirják L, Hóbor R, Haris A, Polner K, Varga L. C1-inhibitor autoantibodies in SLE. Lupus. 2010 Apr;19(5):634-8.

142 Stanilova SA, Slavov ES. Comparative study of circulating immune complexes quantity detection by three assays--CIF-ELISA, C1q-ELISA and anti-C3 ELISA. J Immunol Methods. 2001 Jul 1;253(1-2):13-21.

143 Srivastava SK, Antal P, Gál J, Hullám G, Semsei AF, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Lack of evidence for association of two functional SNPs of CHI3L1 gene (HC-gp39) with rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. 2011 Aug; 31(8):1003-7.

144 Magyar A, Brózik M, Hudecz F. Filaggrin peptides with citrulline for diagnosis and monitoring of autoantibodies in rheumatoid arthritis. Collection Symposium Series Biologically Active Peptides. 2011;13:80-84.

145 Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Anal Biochem. 1970 Apr;34(2):595-8.

146 Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, Carr B, Redman CW, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. Nanomedicine. 2011 Dec;7(6):780-8.

147 Cohen IR. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. J Autoimmun. 2007 Dec; 29(4):246-9.

148 Zick Y, Eisenstein M, Goren RA, Hadari YR, Levy Y, Ronen D. Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. Glycoconj J. 2004;19(7-9):517-26.

149 Eshkar Sebban L, Ronen D, Levartovsky D, Elkayam O, Caspi D, Aamar S, Amital H, Rubinow A, Golan I, Naor D, Zick Y, Golan I. The involvement of CD44 and its novel ligand galectin-8 in apoptotic regulation of autoimmune inflammation. *J Immunol.* 2007 Jul 15;179(2):1225-35.

150 Massardo L, Metz C, Pardo E, Mezzano V, Babul M, Jarpa E, Guzmán AM, André S, Kaltner H, Gabius HJ, Jacobelli S, González A, Soza A. Autoantibodies against galectin-8: their specificity, association with lymphopenia in systemic lupus erythematosus and detection in rheumatoid arthritis and acute inflammation. *Lupus.* 2009 May;18(6):539-46.

151 Nyirkos P, Golds EE. Human synovial cells secrete a 39 kDa protein similar to a bovine mammary protein expressed during the non-lactating period. *Biochem J.* 1990 Jul 1;269(1):265-8.

152 Vos K, Steenbakkens P, Miltenburg AM, Bos E, van Den Heuvel MW, van Hogezaand RA, de Vries RR, Breedveld FC, Boots AM. Raised human cartilage glycoprotein-39 plasma levels in patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann Rheum Dis.* 2000 Jul;59(7):544-8.

153 Baka Z, Buzás E, Nagy G. Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(4):238. DOI: 10.1186/ar2751

154 Baka Z, György B, Géher P, Buzás EI, Falus A, Nagy G. Citrullination under physiological and pathological conditions. *Joint Bone Spine.* 2012 Oct;79(5):431-6.

155 Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J.* 1950 Sep 30;2 (4682):739-48.

156 Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer HU, Catrina AI, Klareskog L, Jurdic P, Schett G. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by

human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest.* 2012 May 1;122(5):1791-802.

157 Takagi K, Kawaguchi Y, Hara M, Sugiura T, Harigai M, Kamatani N. Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features. *Clin Exp Immunol.* 2003 Dec;134(3):538-44.

158 Nagy G, Perl A. The role of nitric oxide in abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2006 Feb-Mar;118(2-3):145-51.

159 De Paepe B, Racz GZ, Schröder JM, De Bleecker JL. Expression and distribution of the nitric oxide synthases in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol.* 2004 Jul;108(1):37-42.

160 Nagy G, Clark JM, Buzás EI, Gorman CL, Cope AP. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. *Immunol Lett.* 2007 Jul 31;111(1):1-5.

161 Griffiths EJ, Rutter GA. Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Nov;1787(11):1324-33.

162 Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Oct;287(4):C817-33.

163 Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol.* 2000 Nov 15;529(1):57-68.

164 Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* 1993 Oct 29;262(5134):744-7.

165 Rizzuto R, Duchen MR, Pozzan T. Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Sci STKE.* 2004 Jan 13;2004(215):re1.

166 Gergely P Jr, Niland B, Goncoroff N, et al. Persistent mitochondrial hyperpolarization, increased reactive oxygen intermediate production, and cytoplasmic alkalinization characterize IL-10 signaling in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2002;169:1092-1101.

167 Scarlett JL, Sheard PW, Hughes G, et al. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Lett* 2000;475:267-272.

168 Perl A, Gergely P Jr, Nagy G, Koncz A, Banki K. Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends Immunol* 2004;25:360-367.

169 Perl A, Nagy G, Gergely P, Puskas F, Qian Y, Banki K. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Methods Mol Med*. 2004;102:87-114.

170 Vassilopoulos D, Kovacs B, Tsokos GC. TCR/CD3 complex-mediated signal transduction pathway in T cells and T cell lines from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 1995 Aug 15;155(4):2269-81.

171 Belmont HM, Levartovsky D, Goel A, Amin A, Giorno R, Rediske J, Skovron ML, Abramson SB. Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997 Oct;40(10):1810-6.

172 Weinberg JB, Granger DL, Pisetsky DS, Seldin MF, Misukonis MA, Mason SN, Pippen AM, Ruiz P, Wood ER, Gilkeson GS. The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered NG-monomethyl-L-arginine. *J Exp Med*. 1994 Feb 1;179(2):651-60.

173 Gilkeson GS, Mudgett JS, Seldin MF, Ruiz P, Alexander AA, Misukonis MA, Pisetsky DS, Weinberg JB. Clinical and serologic manifestations of autoimmune disease in MRL-lpr/lpr mice lacking nitric oxide synthase type 2. *J Exp Med*. 1997 Aug 4;186(3):365-73.

174 Choi JW. Nitric oxide production is increased in patients with rheumatoid arthritis but does not correlate with laboratory parameters of disease activity. *Clin Chim Acta*. 2003 Oct;336(1-2):83-7.

175 Yu CC, Yang CW, Wu MS, Ko YC, Huang CT, Hong JJ, Huang CC. Mycophenolate mofetil reduces renal cortical inducible nitric oxide synthase mRNA expression and diminishes glomerulosclerosis in MRL/lpr mice. *J Lab Clin Med*. 2001 Jul;138(1):69-77.

176 Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus*. 2005;14 Suppl 1:s2-8.

177 van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology*. 2001 Jul;103(3):255-61.

178 Nagy G, Koncz A, Philips PE, Perl A. Mitochondrial signal transduction abnormalities in systemic lupus erythematosus *Curr Immunol Rev* 2005; 1:61-67.

179 Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzás E, Perl A. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):210.

180 Nagy G, Koncz A, Perl A. T- and B-cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Crit Rev Immunol*. 2005;25(2):123-40.

181 Nagy G, Koncz A, Fernandez D, Perl A. Nitric oxide, mitochondrial hyperpolarization, and T cell activation. *Free Radic Biol Med*. 2007 Jun 1;42(11):1625-31.

182 Ciszak L, Pawlak E, Kosmaczewska A, Potoczek S, Frydecka I. Alterations in the expression of signal-transducing CD3 zeta chain in T cells from patients with chronic

inflammatory/autoimmune diseases. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2007 Nov-Dec;55(6):373-86.

183 Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science. 2002 May 31;296(5573):1634-5.

184 Isomäki P, Panesar M, Annenkov A, Clark JM, Foxwell BM, Chernajovsky Y, Cope AP. Prolonged exposure of T cells to TNF down-regulates TCR zeta and expression of the TCR/CD3 complex at the cell surface. J Immunol. 2001 May 1;166(9):5495-507.

185 Liu H, Rhodes M, Wiest DL, Vignali DA. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. Immunity. 2000 Nov;13(5):665-75.

186 Ono S, Ohno H, Saito T. Rapid turnover of the CD3 zeta chain independent of the TCR-CD3 complex in normal T cells. Immunity. 1995 Jun;2(6):639-44.

187 Dietrich J, Kastrup J, Lauritsen JP, Menné C, von Bülow F, Geisler C. TCRzeta is transported to and retained in the Golgi apparatus independently of other TCR chains: implications for TCR assembly. Eur J Immunol. 1999 May;29(5):1719-28.

188 Kishimoto H, Kubo RT, Yorifuji H, Nakayama T, Asano Y, Tada T. Physical dissociation of the TCR-CD3 complex accompanies receptor ligation. J Exp Med. 1995 Dec 1;182(6):1997-2006.

189 Minami Y, Weissman AM, Samelson LE, Klausner RD. Building a multichain receptor: synthesis, degradation, and assembly of the T-cell antigen receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 1987 May;84(9):2688-92.

190 D'Oro U, Munitic I, Chacko G, Karpova T, McNally J, Ashwell JD. Regulation of constitutive TCR internalization by the zeta-chain. J Immunol. 2002 Dec 1;169(11):6269-78.

191 Myers MD, Sosinowski T, Dragone LL, White C, Band H, Gu H, Weiss A. Src-like adaptor protein regulates TCR expression on thymocytes by linking the ubiquitin ligase c-Cbl to the TCR complex. *Nat Immunol.* 2006 Jan;7(1):57-66.

192 Dragone LL, Shaw LA, Myers MD, Weiss A. SLAP, a regulator of immunoreceptor ubiquitination, signaling, and trafficking. *Immunol Rev.* 2009 Nov;232(1):218-28.

193 Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008 Feb;9(2):102-14.

194 Grosshans H, Filipowicz W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature.* 2008 Jan 24;451(7177):414-6.

195 Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature.* 2003 Nov 27;426(6965):454-60.

196 Peterson LK, Shaw LA, Joetham A, Sakaguchi S, Gelfand EW, Dragone LL. SLAP deficiency enhances number and function of regulatory T cells preventing chronic autoimmune arthritis in SKG mice. *J Immunol.* 2011 Feb 15;186(4):2273-81.

197 Bartholomew BA. Synovial fluid glycosidase activity. *Scand J Rheumatol.* 1972;1(2):69-74.

198 Stephens RW, Ghosh P, Taylor TK, Gale CA, Swann JC, Robinson RG, Webb J. The origins and relative distribution of polysaccharidases in rheumatoid and osteoarthritic fluids. *J Rheumatol.* 1975 Dec;2(4):393-400.

199 Ganguly NK, Kingham JG, Lloyd B, Lloyd RS, Price CP, Triger DR, Wright R. Acid hydrolases in monocytes from patients with inflammatory bowel disease, chronic liver disease, and rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1978 May 20;1(8073):1073-5.

200 Ortutay Z, Polgár A, Gömör B, Géher P, Lakatos T, Glant TT, Gay RE, Gay S, Pállinger E, Farkas C, Farkas E, Tóthfalusi L, Kocsis K, Falus A, Buzás EI. Synovial fluid exoglycosidases are predictors of rheumatoid arthritis and are effective in cartilage glycosaminoglycan depletion. *Arthritis Rheum.* 2003 Aug;48(8):2163-72.

201 Nandakumar KS, Collin M, Olsén A, Nimmerjahn F, Blom AM, Ravetch JV, Holmdahl R. Endoglycosidase treatment abrogates IgG arthritogenicity: importance of IgG glycosylation in arthritis. *Eur J Immunol.* 2007 Oct;37(10):2973-82.

202 Bussink AP, Speijer D, Aerts JM, Boot RG. Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics.* 2007 Oct;177(2):959-70.

203 Popko J, Marciniak J, Zalewska A, Małydk P, Rogalski M, Zwierz K. The activity of exoglycosidases in the synovial membrane and knee fluid of patients with rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2006 May-Jun;35(3):189-92.

204 Gutternigg M, Rendić D, Voglauer R, Iskratsch T, Wilson IB. Mammalian cells contain a second nucleocytoplasmic hexosaminidase. *Biochem J.* 2009 Apr 1;419(1):83-90.

205 Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnäker EM, Tarner IH, Robbins PD, Evans CH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Schölmerich J, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med.* 2009 Dec;15(12):1414-20.

206 Niedermeier M, Pap T, Korb A. Therapeutic opportunities in fibroblasts in inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010 Aug;24(4):527-40.

207 Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med.* 2010 Oct;16(10):458-68.

208 Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009 Aug;9(8):581-93.

209 Toth B, Liebhardt S, Steinig K, Ditsch N, Rank A, Bauerfeind I, Spannagl M, Frieze K, Reininger AJ. Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients. *Thromb Haemost.* 2008 Oct;100(4):663-9.

210 Ghosh AK, Secreto CR, Knox TR, Ding W, Mukhopadhyay D, Kay NE. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood.* 2010 Mar 4;115(9):1755-64.

211 Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, de Marchena E, Ahn YS. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J.* 2003 Jun;145(6):962-70.

212 Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Jan;6(1):21-9.

213 György B, Szabó TG, Pásztói M et al. Membrane vesicles, current state-of-the art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:2667-88.

214 Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2014 Feb 18. doi: 10. 1038/ nrrheum. 2014. 19

215 Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry A.* 2010 Jun;77(6):502-14.

216 Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J, Dignat-George F. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost.* 2009 Jan;7(1):190-7.

217 Lawrie AS, Albanyan A, Cardigan RA, Mackie IJ, Harrison P. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang.* 2009 Apr;96(3):206-12.

218 Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borken C, Prohaska R. Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood*. 2002 Apr 1;99(7):2569-77.

219 Khlebtsov BN, Burygin GL, Matora LY, Shchyogolev SY, Khlebtsov NG. A method for studying insoluble immune complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Feb 24;1670(3):199-207.

220 Gorgani NN, Easterbrook-Smith SB, Altin JG. The formation of insoluble immune complexes between ovalbumin and anti-ovalbumin IgG occurs in at least two distinct phases dependent on reactant concentration and ionic strength. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Oct 7;1317(1):45-54.

221 Biró E, Nieuwland R, Tak PP, Pronk LM, Schaap MC, Sturk A, Hack CE. Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann Rheum Dis*. 2007 Aug;66(8):1085-92.

222 Gyorgy B, Pasztoi M, Buzas EI. Response: systematic use of Triton lysis as a control for microvesicle labeling. *Blood*. 2012;119:2175-2176.

223 Masuko-Hongo K, Sekine T, Ueda S, Kobata T, Yamamoto K, Nishioka K, Kato T. Long-term persistent accumulation of CD8+ T cells in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1997 Oct;56(10):613-21.

224 Burns CM, Tsai V, Zvaifler NJ. High percentage of CD8+, Leu-7+ cells in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 1992 Aug;35(8):865-73.

225 Kang YM, Zhang X, Wagner UG, Yang H, Beckenbaugh RD, Kurtin PJ, Goronzy JJ, Weyand CM. CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Exp Med*. 2002 May 20; 195 (10): 1325-36.

226 Wiegering V, Girschick HJ, Morbach H. B-cell pathology in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis*. 2010;2010:759868.

227 Finnegan S, Clarke S, Gibson D, McAllister C, Rooney M. Synovial membrane immunohistology in early untreated juvenile idiopathic arthritis: differences between clinical subgroups. *Ann Rheum Dis*. 2011 Oct;70(10):1842-50.